



# APPLICATION DE LA RESONANCE PARAMAGNETIQUE ELECTRONIQUE A CHAMP INTENSE A L'ETUDE DE RADICAUX ORGANIQUES DANS LES METALLOPROTEINES

Pierre Dorlet

## ► To cite this version:

Pierre Dorlet. APPLICATION DE LA RESONANCE PARAMAGNETIQUE ELECTRONIQUE A CHAMP INTENSE A L'ETUDE DE RADICAUX ORGANIQUES DANS LES METALLOPROTEINES. Autre. Université Paris Sud - Paris XI, 2000. Français. NNT : . tel-00276417

**HAL Id: tel-00276417**

**<https://theses.hal.science/tel-00276417>**

Submitted on 29 Apr 2008

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

N° ordre : 6318

UNIVERSITE DE PARIS-SUD  
UFR SCIENTIFIQUE D'ORSAY

THESE

Présentée  
pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR EN SCIENCES  
DE L'UNIVERSITE PARIS XI ORSAY

PAR

PIERRE DORLET

SUJET DE LA THESE :

**Application**  
**de la résonance paramagnétique électronique à champ intense**  
**à l'étude de radicaux organiques dans les métalloprotéines**

Soutenance le 17 Novembre 2000 devant la commission d'examen

PR. P. BERTRAND  
PR. A. J. HOFF  
PR. G. T. BABCOCK  
PR. D. MANSUY  
PR. I. MORGENSTERN-BADARAU  
DR. S. UN

Rapporteur  
Rapporteur

N° ordre : 6318

UNIVERSITE DE PARIS-SUD  
UFR SCIENTIFIQUE D'ORSAY

THESE

Présentée  
pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR EN SCIENCES  
DE L'UNIVERSITE PARIS XI ORSAY

PAR

PIERRE DORLET

SUJET DE LA THESE :

**Application**  
**de la résonance paramagnétique électronique à champ intense**  
**à l'étude de radicaux organiques dans les métalloprotéines**

Soutenance le 17 Novembre 2000 devant la commission d'examen

PR. P. BERTRAND  
PR. A. J. HOFF  
PR. G. T. BABCOCK  
PR. D. MANSUY  
PR. I. MORGENSTERN-BADARAU  
DR. S. UN

Rapporteur  
Rapporteur

**A ma Famille**

Je tiens à remercier le Département de Biologie Cellulaire et Moléculaire ainsi que Paul Mathis, de m'avoir accueilli et permis d'effectuer ma thèse dans de bonnes conditions au sein de la Section de Bioénergétique. Merci à Bill Rutherford pour avoir accepté la responsabilité administrative de diriger ma thèse, pour son accueil dans l'équipe PS II, sa disponibilité et sa gentillesse ; merci surtout d'avoir pu me donner l'opportunité de passer deux ans à l'Université d'Etat du Michigan avant ma thèse.

Un grand merci à Sun Un sans qui rien de ce travail n'aurait été réalisé. Sun a toujours été extrêmement disponible chaque fois qu'il en était besoin, en particulier pour toutes les discussions très riches que nous avons eues, et m'a toujours soutenu tout au long de la thèse. J'ai beaucoup appris à son contact et je lui dois beaucoup.

Merci aux Professeurs Patrick Bertrand et Arnold Hoff d'avoir accepté d'être rapporteurs pour ce travail de thèse et merci aux Professeurs Jerry Babcock, Daniel Mansuy, Irène Morgenstern-Badarau et à Sun Un d'avoir accepté d'être membres du jury.

Merci à Anabella Ivancich pour les nombreuses discussions et son soutien, et merci de m'avoir permis de participer au projet sur la cytochrome c peroxydase en me demandant de faire l'analyse théorique des spectres obtenus.

Merci à Tony Mattioli, Alain Boussac, Guillaume Voyard, Moritz Knüpling, Jonathan Hanley, Elena Ghibaudi, Peter Faller, Ruth Edge, Charilaos Goussias, et à toutes les personnes qui sont passées au laboratoire entre novembre 97 et 2000.

Merci à Francesca Leach pour la relecture attentive du manuscrit en fin de rédaction.

Special thanks to Jerry Babcock for the two wonderful years I spent in his lab at Michigan State before my PhD. These were the best so far, I received and learned more than I could say both on a scientific and human side. I am grateful to him and Kristi Westphal, Heather Sackett, Hans Schelvis, Marilena Di Valentin and Cecilia Tommos for keeping regularly in touch after I left and for their continuous support during my thesis ; it helped a good deal. Thanks to Steve Seibold and the prostaglandin synthase team over there for their collaboration and the ongoing project.

Thanks to Professor Richard Sayre and Ling Xiong at Ohio State for the fruitful collaboration on the pheophytin project.

Je remercie enfin toute ma famille pour leur aide et leur soutien continuel tout au long de mes études.



# SOMMAIRE

<b>Introduction</b>	<b>i</b>
<b>I. Chapitre I: Introduction à la RPE à champ intense</b>	<b>1</b>
1. Introduction	1
2. Instrumentation	2
3. Le facteur g	7
4. Le photosystème II	11
5. Conclusion	16
Références	17
<b>II. Chapitre II: Etude de l'orientation de radicaux organiques</b>	<b>21</b>
1. Introduction	21
2. Préparation des échantillons orientés	22
3. Spectres RPE dans le cas des poudres et des solutions gelées	22
4. Traitement des données RPE pour les échantillons orientés à une dimension	25
5. Tyrosine D	28
6. Semiquinone Q <sub>A</sub>	35
7. Phéophytine	39
8. Conclusion	43
Références	44
<b>III. Chapitre III: Etude de l'interaction Y<sub>Z</sub><sup>•</sup>-cluster à manganèse dans le photosystème II</b>	<b>47</b>
1. Introduction	47
2. Théorie des spectres RPE pour deux spins S= 1/2 couplés	48
3. Position et forme du signal S2Y <sub>Z</sub> <sup>•</sup>	53
4. Détermination des paramètres de couplage	57
5. Effets des valeurs de g et des couplages hyperfins du cluster métallique	59
6. Interprétation des résultats	62
7. Conclusion	66
Références	67

<b>Chapitre IV: Etude du composé I de la cytochrome c peroxydase</b>	<b>71</b>
1. Introduction	71
2. Préparation des échantillons	74
3. Théorie	74
4. Etude du composé I du type sauvage de la cytochrome c peroxydase	79
5. Mise en évidence d'un radical transitoire	84
6. Etude du composé I dans le mutant W191G de la CcP	89
7. Conclusion	90
Références	93
 <b>Chapitre V: Etude du composé I de la prostaglandine H synthase</b>	 <b>95</b>
1. Introduction	95
2. Etude du doublet large	97
3. Etude du singulet large	100
4. Conclusion	101
Références	103
 <b>Chapitre VI : Les valeurs de g comme sondes de l'environnement d'un radical</b>	 <b>105</b>
1. Introduction	105
2. Théorie	106
3. Les radicaux $Y_D^{\bullet}$ et $Y_Z^{\bullet}$ dans le photosystème II	108
4. Observation sur $Q_A^{\bullet-}$	111
5. Etude du radical anion phéophytine	112
6. Conclusion	118
Références	119
 <b>Conclusion</b>	 <b>121</b>
 <b>Annexe: Préparations biochimiques</b>	





Le phénomène de résonance paramagnétique électronique a été observée pour la première fois par Eugène Zavoisky en 1944. Il travaillait avec un oscillateur sur une plage de fréquence de 0.5 à 17 MHz. Les premiers spectromètres RPE commerciaux utilisaient une fréquence micro-onde de 9 GHz, ce qui est le cas aujourd'hui encore pour la majorité des spectromètres RPE "conventionnels" disponibles. Cette fréquence correspond à un champ magnétique de 0.3 T pour la valeur de  $g$  de l'électron libre. Au contraire de la résonance magnétique nucléaire, les progrès au niveau de l'instrumentation RPE ont été limités non pas par la technologie des aimants mais par la technologie micro-onde, tant dans le domaine des ondes continues que dans celui des ondes pulsées.

Malgré les problèmes rencontrés, on peut noter une nette progression de l'intérêt porté au développement et aux applications de la RPE à champ intense ces dernières années. Le nombre de spectromètres opérant à des champs magnétiques supérieurs à 1 T est en augmentation depuis ces dernières années. L'une des motivations est l'application de la RPE pour l'étude de radicaux dans les systèmes biologiques. Un spectromètre à champ intense a été récemment construit à Saclay. Ce travail de thèse a porté sur son utilisation pour l'étude de métalloprotéines, en particulier le photosystème II.

Le chapitre I est une introduction générale à la RPE à champ intense et contient une description du spectromètre utilisé. Une présentation succincte du photosystème II est également faite pour introduire les différentes parties du système qui sont étudiées dans la suite de la thèse.

Les propriétés géométriques du tenseur  $g$  ont été utilisées pour étudier l'orientation de cofacteurs radicalaires intervenant au niveau de la séparation de charge photoinduite dans le photosystème II. Les résultats, présentés dans le chapitre II, ont été comparés à la structure cristallographique connue pour les centres réactionnels photosynthétiques des bactéries pourpres.

La RPE à champ intense a également été appliquée à l'étude des systèmes couplés. De tels cas se rencontrent souvent dans les métalloprotéines qui contiennent des espèces organiques radicalaires au cours du cycle catalytique. Le chapitre III montre les avantages de l'utilisation des champs intenses pour l'étude de deux spins  $S=1/2$  couplés à travers l'analyse de l'interaction entre le radical tyrosyle  $Y_Z^\bullet$  et le cluster à manganèse dans le photosystème II. Dans les chapitres IV et V, on s'intéresse à l'interaction entre un spin  $S=1$  et  $S=1/2$  à travers l'étude des composés I de deux peroxydases, la cytochrome  $c$  peroxydase et la prostaglandine synthase, qui présentent des caractéristiques spectroscopiques différentes.

Le dernier chapitre présente une des propriétés les plus intéressantes du tenseur  $g$  qui permet d'obtenir des renseignements sur l'environnement électrostatique immédiat du radical étudié. Deux exemples, l'un concernant les radicaux tyrosyles et l'autre les semiquinones, sont présentés avant une étude plus détaillée sur une troisième famille de radicaux, les phéophytines. Il est montré que la dépendance des valeurs de  $g$  à l'environnement électrostatique d'un radical phéophytine est similaire à celle connue et étudiée des radicaux tyrosyles et semiquinones.

# CHAPITRE I



## INTRODUCTION A LA RPE A CHAMP INTENSE

---

---

## CHAPITRE I :

### INTRODUCTION A LA RPE A CHAMP INTENSE

---

---

#### I. INTRODUCTION

L'application de la RPE à champ intense à des systèmes biologiques a augmenté de façon continue durant les dix dernières années. Les cibles les plus fréquentes d'étude ont été les centres réactionnels photosynthétiques et la ribonucléotide réductase. L'application de la RPE à champ intense va certainement continuer à croître du fait qu'un nombre toujours plus grand de protéines avec des acides aminés redox impliqués dans la catalyse est mis à jour.

Qu'est-ce qu'un champ intense ? La contribution du champ magnétique appliqué sur le spectre enregistré est directe à travers l'effet Zeeman. Cet effet est décrit par l'Hamiltonien:

$$\hat{H} = \beta \mathbf{H} \cdot \tilde{\mathbf{g}} \cdot \hat{\mathbf{S}} \quad (\text{Eq. 1.1})$$

où  $\beta$  est le magnéton de Bohr,  $\mathbf{H}$  le vecteur champ magnétique,  $\mathbf{S}$  l'opérateur de spin et la quantité  $\mathbf{g}$  est un tenseur donc une grandeur anisotrope. Ceci implique que l'amplitude de l'effet Zeeman (la quantité d'énergie fournie au système du fait de l'application d'un champ magnétique statique) dépend de l'orientation du vecteur champ magnétique par rapport aux axes magnétiques de la molécule paramagnétique étudiée. Il y a deux types de réponse à la question posée ci-dessus au sujet de l'intensité d'un champ. Intense peut définir une limite inférieure au-dessus de laquelle l'effet Zeeman est dominant devant toutes les autres contributions à l'Hamiltonien décrivant le système. Pour des radicaux organiques, cette condition est déjà satisfaite même à 9 GHz pour un champ de 0.3 T, la fréquence et l'intensité du champ magnétique auxquelles sont enregistrés les spectres RPE conventionnels. La deuxième définition, qui est retenue en général pour définir la RPE à champ intense, est plus restrictive: un champ intense est la limite inférieure pour laquelle non

seulement l'interaction Zeeman est dominante mais également son anisotropie. Dans ces conditions, on a :

$$\frac{\Delta g}{g_{\text{iso}}} H \gg \Delta H_{1/2}^{\text{hyperfine}} \quad (\text{Eq. 1.2})$$

où  $\Delta g$  est l'anisotropie du facteur  $g$ ,  $g_{\text{iso}}$  la valeur isotrope (la moyenne des trois valeurs principales),  $H$  l'amplitude du champ externe appliqué et  $\Delta H_{1/2}$  la largeur de raie due aux couplages hyperfins non-résolus. Typiquement, l'anisotropie Zeeman pour des radicaux organiques n'est pas plus large que 0.01 en valeur de  $g$ . Elle est donc en général du même ordre de grandeur que l'interaction hyperfine et, pour des radicaux organiques, les champs intenses nécessaires pour que l'anisotropie du tenseur  $g$  soit dominante commencent à plusieurs teslas. Pratiquement, pour obtenir une bonne résolution expérimentale des valeurs de  $g$  sur un spectre, il faut que la différence entre deux valeurs de  $g$  consécutives ( $g_x - g_y$  ou  $g_y - g_z$ ) soit nettement supérieure à l'élargissement de la raie due aux couplages non résolus. La table 1 donne quelques valeurs numériques pour les radicaux rencontrés dans ce travail de thèse.

Radical	$\Delta H_{1/2}$ (T)	$g_{\text{iso}}$	$\Delta g_{\text{min}}$	$H_0$ (T)
Tyrosyle	0.0020	2.0047	0.0025	1.6
Semiquinone	0.0009	2.0046	0.0015	1.2
Phéophytine	0.0014	2.0033	0.0008	3.5

**Table 1.** Données numériques relatives à quelques radicaux.  $\Delta g_{\text{min}}$  représente la plus petite différence entre  $g_x - g_y$  et  $g_y - g_z$ .  $H_0$  est la valeur limite pour laquelle  $\Delta g_{\text{min}} \cdot H_0 / g_{\text{iso}}$  correspond à la largeur de raie  $\Delta H_{1/2}$ . L'anisotropie Zeeman devient dominante sur les spectres à partir d'une valeur de champ magnétique double de  $H_0$ .

## II. INSTRUMENTATION

Pour apprécier à un niveau pratique les conséquences de l'utilisation de fréquences micro-ondes élevées et de champs intenses, il faut considérer les dimensions physiques du problème. A 9 GHz, fréquence à laquelle la plupart des spectromètres RPE fonctionnent, la longueur d'onde correspondante est de 30 mm. En conséquence, les parties du spectromètre telles que guide d'onde

et cavités sont approximativement de cette taille. A 300 GHz, la longueur d'onde correspondante est de 1 mm et la taille des composants réduite en conséquence. D'autre part, alors que le champ magnétique requis pour effectuer des mesures à 9 GHz peut être atteint avec un petit électroaimant à noyau de fer doux, à 300 GHz un aimant supraconducteur de 10 T possédant une haute homogénéité (1 à 10 ppm sur le volume de l'échantillon) est requis.

De nombreuses revues techniques détaillées et des descriptions de spectromètres existent dans la littérature<sup>1-4</sup>. La plupart du travail effectué en RPE à champ intense sur les échantillons biologiques l'a été sur deux types de spectromètre très différents. Le premier type est basé sur l'utilisation d'une cavité et fonctionne sur le même principe que les spectromètres conventionnels à 9 GHz. Les spectromètres à 95 GHz disponibles commercialement appartiennent à cette catégorie<sup>5</sup>. Le deuxième type de spectromètre n'utilise pas de cavité et ressemble davantage à un spectromètre d'absorption optique. La première catégorie devrait être techniquement supérieure avec une meilleure sensibilité et une utilisation plus efficace de la puissance micro-onde. Cette supériorité est largement due à l'utilisation d'une cavité. Cependant, il y a plusieurs désavantages. La taille d'un résonateur donné est limitée par la longueur d'onde. A 300 GHz la cavité est de l'ordre de 1 mm. Avec une telle taille, la manipulation des échantillons est loin d'être triviale. Feher a montré que pour un nombre donné de spins, la sensibilité du spectromètre augmente avec la fréquence. Cependant, pour une concentration donnée de spins, la sensibilité est pratiquement constante en fonction de la fréquence. Ceci provient du fait que, lorsque la fréquence du spectromètre augmente, le volume total de l'échantillon diminue. Les systèmes basés sur des cavités sont donc optimaux pour des études sur des monocristaux ou pour les cas où la quantité d'échantillon est un facteur limitant.

Les systèmes sans cavité, comme celui qui a été utilisé dans ce travail de thèse, n'ont clairement pas une sensibilité aussi élevée que les systèmes basés sur l'utilisation d'un résonateur (la perte de sensibilité est d'au moins un facteur 1000). Une telle perte de sensibilité rend l'utilisation de ces spectromètres peu adéquate pour les études sur monocristal. Cependant, la perte de sensibilité est compensée par plusieurs facteurs. Le spectromètre est plus simple dans sa conception et sa construction donc moins coûteux et plus robuste. Sans cavité, les contraintes sur la géométrie des échantillons sont nettement plus flexibles. Ceci est très utile pour travailler sur des échantillons biologiques. Les échantillons utilisés dans le spectromètre de Saclay peuvent occuper un volume cylindrique de 15 à 20 mm de hauteur et 10 mm de diamètre. L'un des avantages majeurs est que

l'on peut ainsi utiliser les tubes RPE conventionnels de 4 mm de diamètre ce qui nous permet d'étudier et de caractériser des échantillons dans un spectromètre standard à 9 GHz puis de les transférer dans le spectromètre à champ intense pour obtenir les spectres RPE jusqu'à des fréquences de 285 GHz.

Le spectromètre RPE à champ intense construit à Saclay et utilisé pour ce travail de thèse est décrit plus en détail dans cette section. Le principe du spectromètre est le même que celui décrit par Muller et ses collaborateurs au laboratoire des champs magnétiques intenses de Grenoble<sup>6</sup>. Le schéma du spectromètre est représenté sur la figure 1. La table 2 donne quelques valeurs numériques liées aux fréquences d'utilisation.

Fréquence (GHz)	Longueur d'onde (mm)	Valeur du champ magnétique pour $g=2.0$ (T)	Fréquence RMN correspondante pour le proton (MHz)	Largeur de champ correspondant à $\Delta g=0.001$ (mT)
10 (bande X)	30	0.3	15	0.2
35 (bande Q)	9	1.2	60	0.6
95 (bande W)	3	3	150	1.5
190	1.5	6	300	3.0
285	1	10	450	5.0

**Table 2.** Quelques données numériques liées aux fréquences utilisées en RPE. Les données en bleu correspondent aux fréquences disponibles pour le spectromètre à champ intense construit à Saclay.

La source que nous avons utilisée initialement est une diode Gunn (Epsilon-Lambda, Geneva, IL) qui émet sur une plage de fréquences de 90 à 100 GHz avec une puissance de sortie maximale de 90 mW. La fréquence est mesurée au moyen d'un fréquencemètre (EIP Microwave Inc., Milpitas, CA) qui a une précision spécifiée par le constructeur inférieure à 1 kHz. Par la suite, cette diode Gunn a été remplacée par un synthétiseur (ELVA-1, Saint-Petersbourg, Russie) capable de générer une puissance minimale de sortie de 100 mW sur une plage de 93 à 97 GHz. La stabilité en fréquence du synthétiseur est de quelques kHz sur plusieurs heures. La source est suivie d'un isolateur, d'un coupleur directionnel de 20 dB qui fournit la puissance micro-onde pour le



fréquence-mètre puis d'un atténuateur variable à 30 dB. Suivant les besoins, la fréquence de base de 95 GHz peut être multipliée en utilisant un doubleur ou un tripleur de fréquence (Radiometric Physics, Menkenheim, Allemagne). La puissance maximale en sortie est alors de 3 à 4 mW. La puissance micro-onde absorbée par l'échantillon est mesurée au moyen d'un bolomètre (Queen Mary College Instruments Ltd., Royaume-Uni) utilisé en conjonction avec un amplificateur synchronisé (Stanford Research Systems, Sunnyvale, CA). L'acquisition du signal se fait sur ordinateur.

L'échantillon est placé à l'intérieur de l'insert au niveau de la bobine utilisée pour la modulation en champ. Ceci peut-être fait rapidement à des températures aussi basses que 60 K. Pour changer l'échantillon, la cavité de l'aimant contenant l'insert est pressurisée au moyen d'hélium gazeux, la fenêtre du guide d'onde sortant est retirée et l'échantillon éjecté en utilisant la pression du gaz. Le flot d'hélium permet également de ne pas faire rentrer d'air à l'intérieur de l'aimant. Un nouvel échantillon est placé dans un porte échantillon (tube en polycarbonate) qui est lâché dans le guide d'onde après arrêt du flot d'hélium gazeux et vient se placer au niveau de la bobine de modulation. La procédure de changement de l'échantillon prend environ une minute et il faut ensuite une dizaine de minutes pour rééquilibrer la température à 4.2 K, si nécessaire. La température de l'échantillon est contrôlée de 1.7 à 300 K par un cryostat à flot d'hélium (Oxford Instruments, Oxon, Royaume-Uni). L'hélium utilisé pour la régulation de la température provient de l'hélium liquide dans lequel est immergé l'aimant supraconducteur. Un contrôleur PID, fourni par Oxford, régule la valve en aiguille pour le flot d'hélium ainsi que les éléments de chauffage pour obtenir une température stable au niveau de l'échantillon. Le thermocouple d'origine est placé près de la valve. Un second thermocouple a été ajouté au niveau de l'échantillon pour obtenir une mesure plus précise de la température à cet endroit. Typiquement, lorsque la température au niveau de la valve est de 4.2 K et que l'on utilise une modulation en champ d'amplitude 2 mT, la température au niveau de l'échantillon est de 4.5 K.

Le champ magnétique externe appliqué à l'échantillon pour la mesure de RPE provient d'un aimant supraconducteur à bobine unique (modèle Teslatron, Oxford Instruments, Oxon, Royaume-Uni). La valeur maximale est de 10.5 T. Pour exploiter pleinement les données obtenues par RPE à champ intense, l'aimant doit être calibré. L'alimentation de l'aimant supraconducteur utilisé est équipée d'un système permettant de mesurer l'intensité du courant magnétique, et donc du champ magnétique, avec une précision de 5 ppm. Cependant, la précision absolue dans les conditions

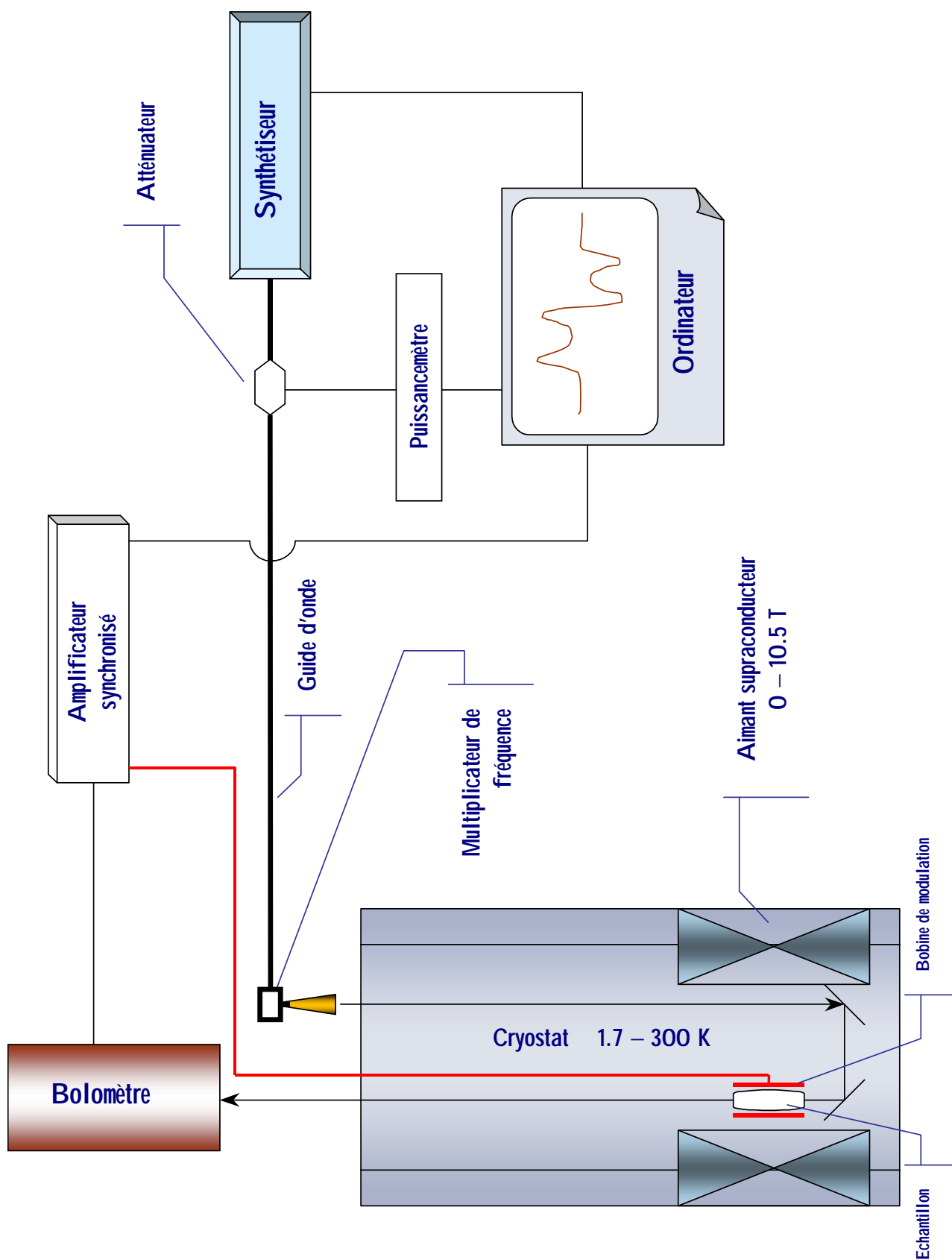


Figure 1. Schéma de principe du spectromètre RPE à champ intense.

expérimentales d'utilisation peut être bien en dessous, jusqu'à un ordre de grandeur plus faible. Dans les systèmes d'aimant qui utilisent deux bobines, l'une fournissant un champ statique élevé et l'autre un champ balayable, le couplage entre les bobines peut aussi être la source d'erreurs dans la mesure du champ magnétique. Un système à bobine unique (ce qui est notre cas) ne souffre pas de ce problème mais augmente la consommation d'hélium. Comme dans le cas des spectromètres conventionnels à 9 GHz, la méthode préférentielle pour éviter les problèmes de mesure de champ magnétique est l'utilisation d'un gaussmètre RMN qui fonctionne en parallèle de l'acquisition des données. Un tel système a été construit à l'Institut Technologique du Massachusetts<sup>7</sup>. Comme l'échantillon RMN utilisé est le plus souvent un liquide deutéré, cela pose des problèmes pour les opérations à températures cryogéniques. Une solution plus simple est le calibrage du champ magnétique en utilisant un échantillon paramagnétique standard dont les valeurs de  $g$  sont connues avec une grande précision. Pour l'aimant que nous utilisons, la valeur du champ magnétique peut être imposée de façon reproductible avec une précision de 0.2 à 0.5 mT suivant les conditions d'utilisation et la valeur nominale du champ. Pour déterminer la valeur absolue du champ, un échantillon d'oxyde de magnésium dopé au manganèse II (Mn:MgO) est utilisé ( $g=2.00101$ )<sup>8</sup>. La largeur de raie du signal du Mn:MgO est de l'ordre de 0.05 mT, ce qui est la résolution de notre aimant. Ainsi, dans les conditions optimales d'utilisation, l'erreur la plus importante attendue est d'environ 2 parties pour 10 millions en champ soit 0.00004 en valeur de  $g$ .

### III. LE FACTEUR $g$

L'un des atouts remarquables de la RPE à champ intense est la résolution accrue de l'anisotropie de  $g$  pour les radicaux organiques. Cette anisotropie du facteur  $g$  est une propriété d'ensemble propre au radical. La théorie des valeurs de  $g$  pour les radicaux date d'il y a plus de trente ans mais a été peu utilisée et appliquée. Cela a été dû en partie au manque de données expérimentales précises. Cette situation change rapidement avec un nombre de spectromètres à champ intense utilisés en accroissement constant. Les expressions donnant les valeurs de  $g$  sont complexes et les essais d'utilisation quantitative ont rencontré un succès limité, à l'exception notable des radicaux tyrosyles et semiquinoniques. En fait, comme nous allons le voir, les versions simplifiées de ces expressions peuvent être utilisées pour rationaliser et prédire qualitativement l'anisotropie de  $g$  des radicaux.

La théorie détaillée des valeurs de  $g$  est décrite dans les publications de Stone<sup>9-11</sup> (plus récemment, les expressions obtenues par Stone ont été corrigées par Törring et ses collaborateurs<sup>12</sup>). Stone a montré que les premières expressions, obtenues par Pryce en utilisant une théorie modifiée des perturbations au second degré pour obtenir les valeurs de  $g$ <sup>13</sup>, n'étaient pas invariantes vis-à-vis d'une translation du système de coordonnées (invariance de jauge). Pour corriger cela, il a déduit une nouvelle expression pour les valeurs de  $g$  en partant de l'Hamiltonien relativiste de Dirac. Cette correction de jauge résulte du couplage du spin électronique avec le courant diamagnétique induit par l'application du champ magnétique. D'autre part, un terme additionnel doit être inclus à ces expressions pour tenir compte de la correction de masse relativiste d'un électron en mouvement<sup>14</sup>. Dans le cas de composés aromatiques plans, cet effet conduit à une valeur principale de  $g_z$  (composante le long de l'axe perpendiculaire au plan de la molécule) sensiblement plus faible que la valeur de  $g$  pour l'électron libre ( $g_e = 2.002\,319\,304\,373\,7(82)$ ). Globalement, pour un état fondamental non-dégénéré orbitalement, on a :

$$g^{ij} = (g_e - \Delta g_{\text{rel}}) \delta^{ij} + \Delta g_{\text{gc}}^{ij} + \Delta g_{\text{so}}^{ij} \quad (\text{Eq. 1.3})$$

où  $i$  et  $j$  représentent les composantes  $x$ ,  $y$  et  $z$  et  $\delta^{ij}$  est le symbole de Kronecker. Dans cette équation,  $\Delta g_{\text{rel}}$  représente la contribution de la correction de masse relativiste à la valeur de  $g$ ,  $\Delta g_{\text{gc}}$  est la correction de jauge obtenue par Stone et  $\Delta g_{\text{so}}$  est la contribution du couplage spin-orbite et de l'énergie Zeeman orbitale.

Stone a montré que, pour les radicaux, la contribution dominante à l'anisotropie du facteur  $g$  est le couplage spin-orbite de l'état fondamental et des états excités de basse énergie :

$$g_{\text{so}}^{ij} = g_e \sum_{n \neq S} \frac{\langle \Psi_S | \zeta(r) L_i S_i | \Psi_n \rangle \langle \Psi_n | L_j | \Psi_S \rangle}{E_S - E_n} \quad (\text{Eq. 1.4})$$

$\Psi_S$  est l'état fondamental pour la molécule et la sommation est faite sur tous les états  $\Psi_n$  différents de l'état fondamental.  $L$  et  $S$  sont les opérateurs de moment cinétique orbital et de spin pour la molécule,  $E_n$  est l'énergie de l'état  $n$ ,  $\zeta(r)$  est le paramètre de couplage spin-orbite et  $i$  et  $j$  représentent les composantes  $x$ ,  $y$  et  $z$ .

Dans le but de comprendre qualitativement le couplage spin-orbite, il est utile de partir des expressions obtenues à partir de l'approximation LCAO (linear combination of atomic orbitals). Dans l'hypothèse de cette approximation, la fonction d'état  $\Psi_S$  s'écrit comme une combinaison

linéaire des orbitales atomiques. Le couplage spin-orbite est réécrit en fonction d'opérateurs atomiques et la valeur  $\zeta(r)$  devient une constante atomique. L'équation 4 ci-dessus devient :

$$g_{so}^{ij} = g_e \sum_{n \neq s} \sum_{k=\text{atomes}} \frac{\langle \phi_s^k m | \zeta^k l_j s_j | \phi_n^k m' \rangle \langle \phi_n^k m' | l_i | \phi_s^k m \rangle}{E_s - E_n} \quad (\text{Eq. 1.5})$$

où  $\phi^k$  est l'orbitale atomique de l'atome k, m et m' représentent l'état de spin, l et s sont les opérateurs atomiques de moment cinétique orbitalaire et de spin et  $\zeta$  la constante spin-orbite pour l'atome k. Cette expression, même sous cette forme simplifiée, est relativement complexe et comporte des paramètres qui sont difficiles à prévoir ou calculer. Cependant, plusieurs conséquences importantes peuvent être tirées.

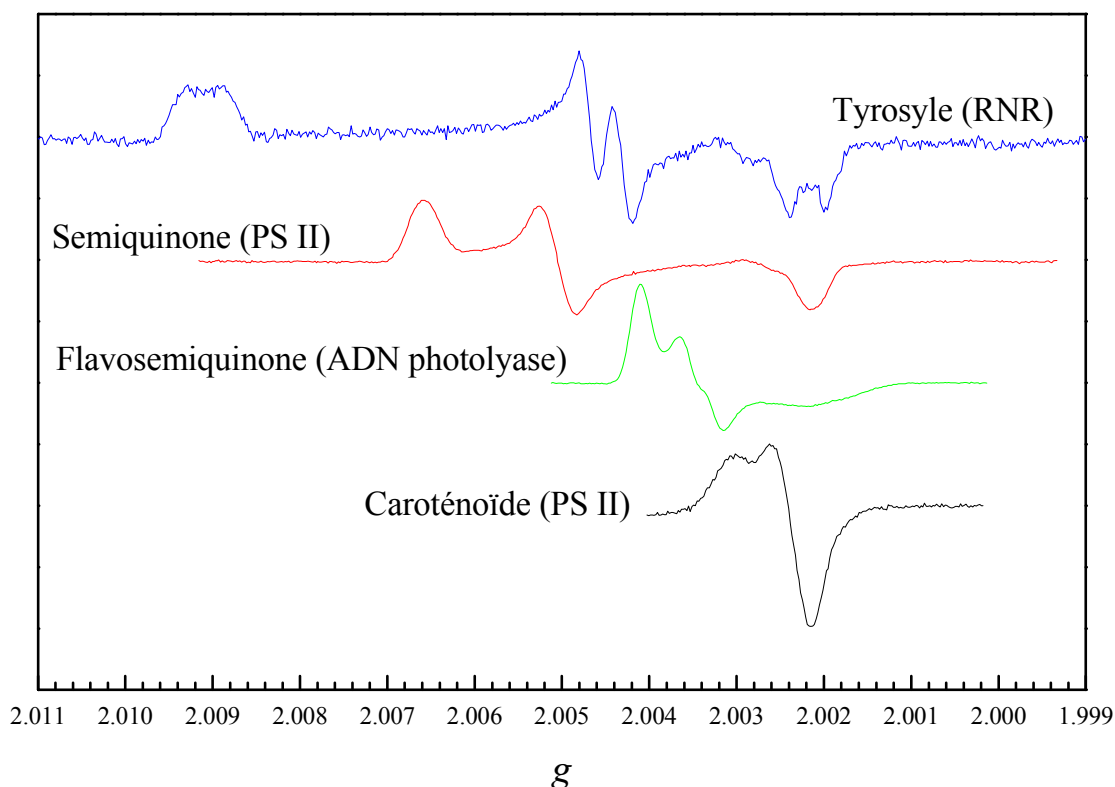
Pour des radicaux de type  $\pi$ , ce qui est le cas de la majorité des radicaux rencontrés dans les enzymes, la contribution du couplage spin-orbite le long de l'axe z est nulle ( $\langle p_x | l_z | p_z \rangle = 0$  et  $\langle p_y | l_z | p_z \rangle = 0$ ) et, par conséquent, la valeur  $g_z$  n'est pas affectée par ce couplage. Angström a montré qu'un petit déplacement négatif de l'ordre de  $10^{-4}$  pour la valeur  $g_z$  se produit pour les radicaux de type  $\pi$  à cause d'effets relativistes (voir plus haut)<sup>14</sup>. Comme tous les radicaux ont une composante commune pour les valeurs de g, il y aura toujours recouvrement spectral, même pour les champs les plus intenses, lorsque plusieurs radicaux sont présents dans l'échantillon. L'équation 1.5 ci-dessus indique également que l'anisotropie du facteur g est directement liée à la densité de spin de l'état fondamental. Si un

C	(Z=6)	28
N	(Z=7)	76
O	(Z=8)	151
S	(Z=16)	382
Cl	(Z=17)	586

**Table 2.** Constantes de couplage spin-orbite de quelques atomes ( $\text{cm}^{-1}$ )

électron non apparié est largement délocalisé du fait de la conjugaison alors l'anisotropie du facteur g ne peut pas être importante. Enfin, il est attendu que les radicaux comportant des hétéroatomes tels que l'oxygène, l'azote ou le soufre vont avoir une anisotropie plus forte que les radicaux simplement hydrocarbonés. Ceci est dû à deux effets: les constantes de couplage spin-orbite augmentent avec le numéro atomique ( $S > O > N > C$ ) (voir table 2) et, d'autre part, les atomes d'oxygène possèdent des paires électroniques non-liantes qui occupent des orbitales  $sp^2$ . Les énergies d'excitation qui correspondent à la transition d'un électron non-liant vers la SOMO (single occupied molecular orbital) sont souvent faibles et les termes  $\langle p_x | l_y | p_z \rangle$  et  $\langle p_y | l_x | p_z \rangle$  valent 1. Ces deux conditions favorisent des contributions spin-orbitales importantes (voir figure 2). Pour les atomes d'azote, une situation similaire se rencontre mais dépend de l'arrangement exact des

liaisons. Par exemple, un azote protoné qui appartient à un hétérocycle conjugué n'aura pas de paire électronique non-liante. Au contraire, un azote non-protoné appartenant à un tel cycle peut apporter une contribution significative à l'anisotropie du facteur  $g$  à travers le couplage spin-orbite. En général, les systèmes  $\pi$  ne possédant que des atomes de carbone ont une anisotropie de  $g$  faible. Les états excités de basse énergie de ces radicaux sont de caractère  $\pi$  ou  $\pi^*$  et ne se mélangent pas à l'état fondamental.



**Figure 2.** Spectres RPE enregistrés à 285 GHz pour divers radicaux et montrant la différence d'anisotropie du facteur  $g$  suivant la présence ou non d'hétéroatomes portant une partie non-négligeable de la densité de spin. Les radicaux tyrosyle et semiquinone sont oxygénés, la flavosemiquinone est un radical azoté et le caroténoïde est un radical carboné.

Au moyen de ces généralisations simples, il est possible de prévoir qualitativement l'anisotropie du facteur  $g$  de nombreux radicaux organiques. Cependant, il est aussi possible d'utiliser l'équation 5 quantitativement. Les équations semi-empiriques d'orbitales moléculaires ont été utilisées avec un

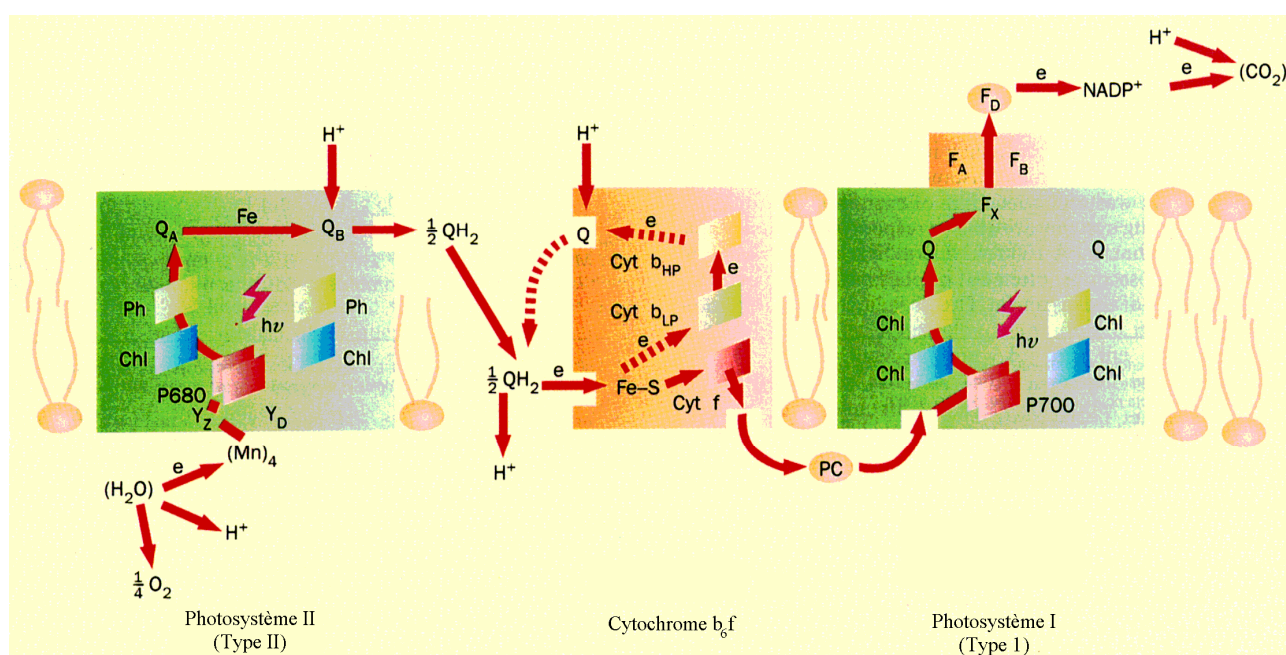
certain succès pour obtenir les valeurs de  $g$ . Cette approche marche remarquablement bien pour les radicaux tyrosyles et semiquinoniques<sup>15,16</sup>. Par exemple, le radical tyrosyle de la ribonucléotide réductase est situé dans une poche hydrophobe et est un bon modèle de radical tyrosyle isolé. Les valeurs obtenues expérimentalement et les valeurs calculées sont en bon accord. Récemment, les valeurs de  $g$  pour un radical tyrosyle obtenu par irradiation gamma de cristaux de tyrosine-HCl ont été mesurées (voir chapitre IV). Une structure par diffraction de neutrons est disponible pour le réseau cristallin et la position des atomes d'hydrogène est connue<sup>17</sup>. Fasanella et Gordy ont utilisé la spectroscopie d'ENDOR pour montrer que les radicaux tyrosyles générés ont une position identique aux molécules non radicalaires de tyrosine dans le cristal<sup>17</sup>. Les valeurs de  $g$  calculées en incorporant les détails structuraux de l'environnement du radical sont en très bon accord avec les valeurs mesurées expérimentalement. Une étude plus qualitative mais plus étendue a également été réalisée pour des semiquinones avec des résultats tout aussi satisfaisants<sup>8,15</sup>. Par contre, pour d'autres types de radicaux, les valeurs de  $g$  calculées diffèrent parfois de manière significative des valeurs mesurées expérimentalement. Les raisons de ces différences ne sont pas claires et toujours en cours d'étude. Des techniques de calcul fiables devront être développées pour pouvoir exploiter pleinement les valeurs de  $g$  mesurées avec une grande précision par l'utilisation de la RPE à champ intense.

L'une des premières applications biologiques de la RPE à champ intense a été l'étude de radicaux organiques présent dans les centres réactionnels photosynthétiques. Les premières études étaient principalement des preuves de principe pour démontrer que les signaux étaient détectables et que les valeurs de  $g$  pouvaient être mesurées avec précision. L'enzyme sur laquelle a porté en grande partie ce travail de thèse est le photosystème II (PS II) qui est l'enzyme responsable du dégagement d'oxygène moléculaire.

#### IV. LE PHOTOSYSTEME II

La photosynthèse oxygénique par les cyanobactéries est apparue il y a quelques trois milliards d'années. Ce phénomène est responsable du remplacement de l'atmosphère réductrice qui existait alors par une atmosphère oxydante. Le processus d'oxydation de l'eau en dioxygène est réalisé par une enzyme de la chaîne photosynthétique, le photosystème II, que l'on rencontre chez les cyanobactéries et les végétaux supérieurs. Le photosystème II est une grosse protéine membranaire

constituée de plusieurs sous-unités intrinsèques et extrinsèques<sup>18-21</sup>. Il utilise l'énergie solaire pour catalyser l'oxydation de l'eau et la réduction de plastoquinones. Ces plastoquinones servent ensuite de donneurs d'électrons pour le complexe  $b_6/f$ , responsable de la réduction d'une petite protéine soluble, la plastocyanine. Cette plastocyanine sert à son tour de donneur d'électron à l'autre centre réactionnel important de la membrane photosynthétique, le photosystème I (PS I). Le photosystème I intervient dans la réduction d'une ferrédoxine qui est ensuite utilisée pour la réduction du  $\text{NADP}^+$  en NADPH qui est ensuite utilisé dans le cycle de Calvin pour synthétiser des sucres à partir du dioxyde de carbone atmosphérique. L'ensemble des processus essentiels intervenant au niveau de la membrane photosynthétique est résumé sur la figure 3.

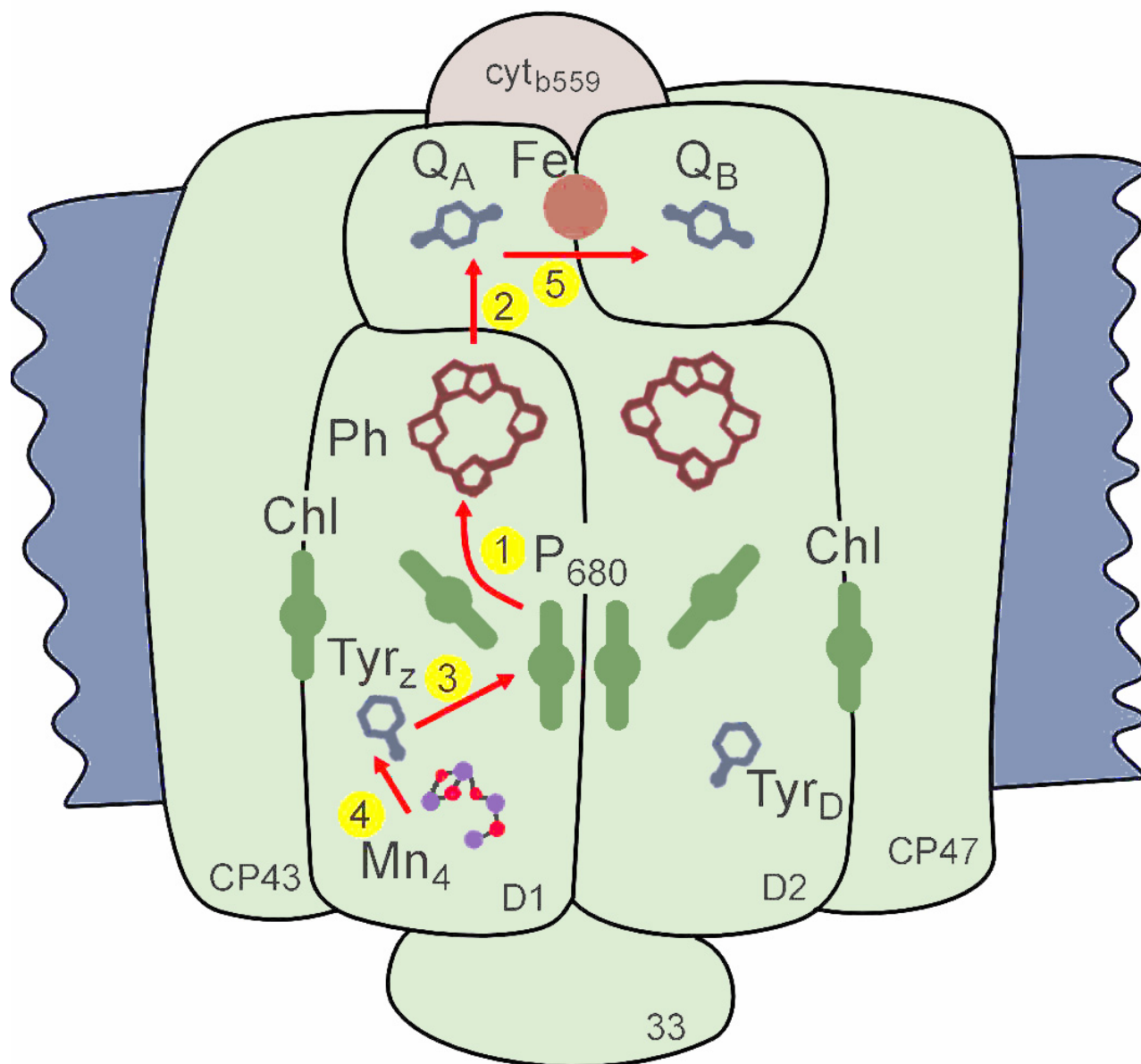


**Figure 3.** Représentation schématique de la chaîne photosynthétique chez les plantes et cyanobactéries (adaptée de la référence 22). Chl : chlorophylle; Ph : phéophytine; Q : quinone (plastoquinone dans PS II et phyloquinone dans PS I); Fe : fer non-hémique;  $F_X$ ,  $F_A$ ,  $F_B$  : centres fer-soufre bas potentiel;  $F_D$  : ferrédoxine; PC : plastocyanine; Cyt : cytochrome.

Contrairement au cas des centres réactionnels des bactéries pourpres et du photosystème I, il n'existe pas, à ce jour, de structure cristallographique détaillée publiée de l'enzyme. Cependant, des résultats très récents concernant une telle structure ont été présentés par H. Witt et P. Orth à la 11<sup>ème</sup> conférence européenne de bioénergétique en septembre 2000<sup>23</sup>. Il est donc raisonnable de penser qu'une étude par diffraction des rayons X concernant le PS II va être publiée dans un futur proche. En attendant, la figure 4 est une représentation schématique de l'enzyme et de ses principaux



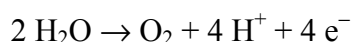
cofacteurs basée sur la structure connue du centre réactionnel des bactéries pourpres ainsi que des nombreux résultats obtenus des études du PS II. Dans ce travail de thèse, les informations géométriques inhérentes au tenseur  $g$  ont été utilisées pour obtenir l'orientation de certains cofacteurs. Cette étude fait l'objet du chapitre II.



**Figure 4.** Représentation schématique du Photosystème II. Les flèches indiquent les transferts d'électron et les numéros leur séquence respective.

Dans le photosystème II, la photoexcitation d'une entité chlorophyllienne, appelée  $P_{680}$  ou donneur primaire, initie une séparation de charge en formant un état singulet hautement réducteur. La nature du donneur primaire a été clarifiée récemment par une série d'expériences impliquant des mutations au niveau des ligands axiaux des chlorophylles impliquées dans ce processus<sup>24</sup>. Les différents cofacteurs et transferts d'électron sont représentés sur la figure 4. Après photoexcitation, un électron est transmis à une molécule de phéophytine-a voisine pour former l'état  $P_{680}^+ Ph^-$  puis à une molécule de plastoquinone,  $Q_A$ , qui fonctionne comme accepteur monoélectronique. Afin de stabiliser la séparation de charge, le cation  $P_{680}^+$  est réduit par un résidu tyrosine du polypeptide  $D_1$ ,  $Y_Z$ , qui forme un radical neutre,  $Y_Z^\bullet$ , avant d'être à son tour réduit par un cluster métallique constitué de quatre ions manganèse. L'électron sur  $Q_A$  est ensuite transmis à une deuxième molécule de plastoquinone,  $Q_B$ , qui fonctionne comme accepteur biélectronique et qui quitte le centre réactionnel, après protonation et double réduction, sous forme de quinol pour être remplacée par une autre molécule de quinone. Un ion  $Fe(II)$  non hémique est situé entre  $Q_A$  et  $Q_B$  à l'interface des polypeptides  $D_1$  et  $D_2$ .

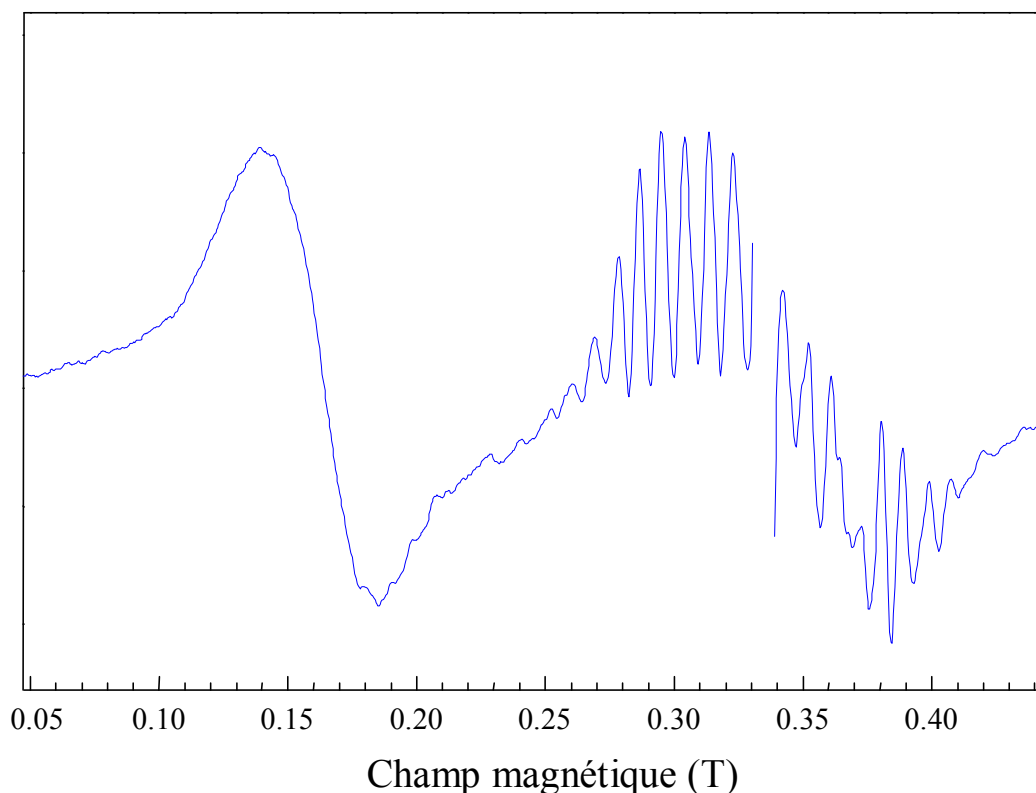
Le site catalytique de l'oxydation de l'eau, appelé centre de dégagement d'oxygène, est constitué du cluster à manganèse et de deux cofacteurs essentiels, les ions calcium et chlorure. Ces dernières années, différents travaux ont conduit à la proposition d'un mécanisme réactionnel pour l'oxydation de l'eau<sup>25-27</sup>. Dans ce modèle,  $Y_Z$  fait partie intégrante du site catalytique et agit comme abstracteur d'atome d'hydrogène sur les molécules d'eau fixées aux ions manganèse du cluster. La réaction d'oxydation de l'eau est une réaction à quatre électrons :



il faut donc quatre séparations de charge à l'intérieur du centre réactionnel avant que la réaction n'aboutisse. Le cluster à manganèse agit comme accumulateur de charges et stocke quatre équivalents oxydants au cours du cycle catalytique. Les différents états de ce cycle sont appelés états  $S_n$  où  $n$  représente l'état d'oxydation global du complexe de dégagement d'oxygène. L'état stable à l'obscurité est l'état  $S_1$ . Les transitions  $S_n \rightarrow S_{n+1}$  (où  $n = 0, \dots, 3$ ) nécessite une photoexcitation. L'état  $S_4$  est un état instable et évolue de lui-même vers l'état  $S_0$ . C'est au cours de cette étape que se produit le dégagement d'oxygène moléculaire.

Certains des états  $S$  sont paramagnétiques et des signaux RPE correspondants à ces états ont pu être observés. Le premier signal RPE attribué au cluster à manganèse a été observé par Dismukes et

ses collaborateurs en 1981<sup>28</sup>. Il correspond à l'état  $S_2$  et possède une structure multiligne caractéristique. Ce signal est d'ailleurs appelé signal multiligne. Cette structure provient du couplage hyperfin des ions manganèse formant le cluster ( $I_{Mn} = 5/2$ ). Le spectre est interprété comme provenant d'un état fondamental de spin effectif  $S=1/2$ . Un autre signal également attribué à l'état  $S_2$  a été découvert un peu plus tard. Il est centré à  $g = 4.1$  et il a été récemment montré qu'il provient d'un état de spin  $S=5/2$ <sup>29</sup>. Ces deux signaux sont représentés sur la figure 5. Le signal multiligne peut être accumulé par éclaircissement à 200 K d'une préparation de PS II. Lorsqu'on irradie avec de la lumière infrarouge la préparation qui présente le signal multiligne, celui-ci est converti en signal à  $g = 4.1$ <sup>30</sup>. Cette conversion est réversible par incubation de l'échantillon à l'obscurité à 200 K. Si l'éclaircissement infrarouge se fait à des températures de l'ordre de 65 K, on obtient de nouveaux signaux à  $g = 10$  et  $g = 6$ <sup>31</sup>.



**Figure 5.** Spectre RPE à 9 GHz enregistré sur une préparation de cores de PS II dans l'état  $S_2$ .

Des signaux RPE ont également été observés récemment pour les états  $S_0$ <sup>32-34</sup> et  $S_1$ <sup>35</sup>. En particulier, l'état  $S_0$  présente également un signal multiligne mais qui diffère par sa largeur et la

position des raies de celui observé pour l'état  $S_2$ . Enfin, des signaux, observés en modes parallèle et perpendiculaire, ont été attribués à l'état  $S_3$  du cycle catalytique<sup>36,37</sup>. Par contraste, il est possible, dans des préparations inhibées de PS II, de piéger un état qui est formellement dans l'état  $S_3$  du point de vue de l'état d'oxydation global du centre de dégagement d'oxygène mais qui ne correspond pas à l'état  $S_3$  du cycle catalytique normal. Cet état présente un signal RPE caractéristique dont l'étude fait l'objet du chapitre III.

## V. CONCLUSION

Ce chapitre a mis en place les connaissances générales utiles pour pouvoir aborder les travaux réalisés et présentés dans les chapitres suivants. La majeure partie du travail de thèse a porté sur le photosystème II. Deux autres systèmes, les composés I de la cytochrome c peroxydase et de la prostaglandine synthase, ont également été étudiés. Leur présentation est faite dans l'introduction des chapitres qui concernent ces études (chapitre IV et V).

## RÉFÉRENCES

- [1] PRISNER, T. F. (1996) in *Advances in Magnetic and Optical Resonance* (Warren, W. S., Ed.) Vol. 20, p 245. Academic Press, San Diego.
- [2] BECERRA, L. R., GERFEN, G. J., BELLEW, B. F., BRYANT, J. A., HALL, D. A., INATI, S. J., WEBER, R. T., UN, S., PRISNER, T. F., MCDERMOTT, A. E., FISHBEIN, K. W., KREISCHER, K. E., TEMKIN, R. J., SINGEL, D. J. & GRIFFIN, R. G. (1995) A spectrometer for dynamic nuclear polarization and electron paramagnetic resonance at high frequencies. *J Magn Reson, Ser A* **117**, 28-40.
- [3] BUDIL, D. E., EARLE, K. A., LYNCH, B. & FREED, J. (1989) in *Advanced EPR in Biology and Biochemistry* (Hoff, A. J., Ed.) p 307. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.
- [4] GRINBERG, O. Y., DUBINSKII, A. A. & LEBEDEV, Y. S. (1983) Electron paramagnetic resonance of free radicals in the two-millimeter wavelength range. *Russ Chem Rev* **52**, 850-865.
- [5] SCHMALBEIN, D., MARESCH, G. G., KAMLOWSKI, A. & HOFER, P. (1999) The Bruker high-frequency-EPR system. *Applied Magnetic Resonance* **16**, 185-205.
- [6] MULLER, F., HOPKINS, M. A., CORON, N., GRYNBERG, M., BRUNEL, L. C. & MARTINEZ, G. (1989) A high-magnetic field EPR spectrometer. *Rev Sci Instrum* **60**, 3681-3684.
- [7] UN, S., BRYANT, J. A. & GRIFFIN, R. G. (1993) Precision field-sweep system for superconducting solenoids and its application to high-frequency EPR spectroscopy. *J Magn Reson, Series A* **101**, 92-94.
- [8] BURGHAUS, O., PLATO, M., ROHRER, M., MÖBIUS, K., MACMILLAN, F. & LUBITZ, W. (1993) 3-mm high-field EPR on semiquinone radical anions  $Q^{\bullet-}$  related to photosynthesis and on the primary donor  $P^+$  and acceptor  $Q_A^{\bullet-}$  in reaction centers of *Rhodobacter sphaeroides* R-26. *Journal of Physical Chemistry* **97**, 7639-7647.
- [9] STONE, A. J. (1963) Gauge invariance of the g tensor. *Proc R Soc London, Ser A* **271**, 424-34.
- [10] STONE, A. J. (1963) g factors of aromatic free radicals. *Mol Phys* **6**, 509-15.
- [11] STONE, A. J. (1964) g tensors of aromatic hydrocarbons. *Mol Phys* **7**, 311-16.
- [12] TÖRRING, J. T., UN, S., KNÜPLING, M., PLATO, M. & MÖBIUS, K. (1997) On the calculation of g tensors of organic radicals. *The Journal of Chemical Physics* **107**, 3905-3913.
- [13] PRYCE, M. H. L. (1950) A modified perturbation procedure for a problem in paramagnetism. *Proc. Phys. Soc. A* **63**, 25-29.
- [14] ANGSTL, R. (1989) Contribution of the relativistic mass correction to the g tensor of molecules. *Chemical Physics* **132**, 435-442.

- [15] KNÜPLING, M., TÖRRING, J. T. & UN, S. (1997) The relationship between the molecular structure of semiquinone radicals and their g-values. *Chemical Physics* **219**, 291-304.
- [16] UN, S., ATTA, M., FONTECAVE, M. & RUTHERFORD, A. W. (1995) g-values as a probe of the local protein environment: high-field EPR of tyrosyl radicals in ribonucleotide reductase and photosystem II. *Journal of the American Chemical Society* **117**, 10713-19.
- [17] FASANELLA, E. L. & GORDY, W. (1969) Electron spin resonance of an irradiated single crystal of L-tyrosine- HCl. *Proc Natl Acad Sci U S A* **62**, 299-304.
- [18] RUTHERFORD, A. W., ZIMMERMANN, J. L. & BOUSSAC, A. (1992) in *The Photosystems: Structure, Function and Molecular Biology* (Barber, J., Ed.) Chapter 5. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.
- [19] DEBUS, R. J. (1992) The manganese and calcium ions of photosynthetic oxygen evolution. *Biochim Biophys Acta* **1102**, 269-352.
- [20] BRITT, R. D. (1996) in *Oxygenic Photosynthesis: The Light Reactions* (Ort, D. R. and Yocum, C. F., Ed.) pp 137-164. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- [21] DINER, B. A. & BABCOCK, G. T. (1996) in *Oxygenic Photosynthesis: The Light Reactions* (Ort, D. R. and Yocum, C. F., Ed.) pp 213-247. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- [22] BARBER, J. & ANDERSSON, B. (1994) Revealing the blueprint of photosynthesis. *Nature* **370**, 31-34.
- [23] WITT, H. T. & ORTH, P. (2000) *11th European Bioenergetics Conference*, Sussex, UK
- [24] DINER, B. A. (2000) Cours au Collège de France.
- [25] HOGANSON, C. W. & BABCOCK, G. T. (1997) A metalloradical mechanism for the generation of oxygen from water in photosynthesis. *Science* **277**, 1953-6.
- [26] BABCOCK, G. T., ESPE, M., HOGANSON, C., LYDAKIS-SIMANTIRIS, N., MCCracken, J., SHI, W., STYRING, S., TOMMOS, C. & WARNCKE, K. (1997) Tyrosyl radicals in enzyme catalysis: some properties and a focus on photosynthetic water oxidation. *Acta Chem Scand* **51**, 533-40.
- [27] TOMMOS, C. & BABCOCK, G. T. (2000) Proton and hydrogen currents in photosynthetic water oxidation. *Biochim Biophys Acta* **1458**, 199-219.
- [28] DISMUKES, G. C. & SIDERER, Y. (1981) Intermediates of a polynuclear manganese center involved in photosynthetic water oxidation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**, 274-278.
- [29] HORNER, O., RIVIERE, E., BLONDIN, G., UN, S., RUTHERFORD, A. W., GIRERD, J. J. & BOUSSAC, A. (1998) SQUID magnetization study of the infrared-induced spin transition in the S<sub>2</sub> state of photosystem II: Spin value associated with the g = 4.1 EPR signal. *Journal of the American Chemical Society* **120**, 7924-7928.

- [30] BOUSSAC, A., GIRERD, J. J. & RUTHERFORD, A. W. (1996) Conversion of the spin state of the manganese complex in photosystem II induced by near-infrared light. *Biochemistry* **35**, 6984-9.
- [31] BOUSSAC, A., UN, S., HORNER, O. & RUTHERFORD, A. W. (1998) High-spin states ( $S \approx 5/2$ ) of the photosystem II manganese complex. *Biochemistry* **37**, 4001-4007.
- [32] MESSINGER, J., NUGENT, J. H. A. & EVANS, M. C. W. (1997) Detection of an EPR multiline signal for the  $S_0$  state in photosystem II. *Biochemistry* **36**, 11055-11060.
- [33] AHRLING, K. A., PETERSON, S. & STYRING, S. (1997) An oscillating manganese electron paramagnetic resonance signal from the  $S_0$  state of the oxygen evolving complex in photosystem II. *Biochemistry* **36**, 13148-13152.
- [34] BOUSSAC, A., KUHLE, H., GHIBAUDI, E., ROGNER, M. & RUTHERFORD, A. W. (1999) Detection of an electron paramagnetic resonance signal in the  $S_0$  state of the manganese complex of photosystem II from *Synechococcus elongatus*. *Biochemistry* **38**, 11942-11948.
- [35] CAMPBELL, K. A., PELOQUIN, J. M., PHAM, D. P., DEBUS, R. J. & BRITT, R. D. (1998) Parallel polarization EPR detection of an  $S_1$  state "multiline" EPR signal in photosystem II particles from *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Journal of the American Chemical Society* **120**, 447-448.
- [36] MATSUKAWA, T., MINO, H., YONEDA, D. & KAWAMORI, A. (1999) Dual-Mode EPR Study of New Signals from the  $S_3$  State of Oxygen-Evolving Complex in Photosystem II. *Biochemistry* **38**, 4072-4077.
- [37] IOANNIDIS, N. & PETROULEAS, V. (2000) Electron paramagnetic resonance signals from the  $S_3$  state of the oxygen-evolving complex. A broadened radical signal induced by low-temperature near-infrared light illumination. *Biochemistry* **39**, 5246-54.

## CHAPITRE II



### ETUDE DE L'ORIENTATION DE RADICAUX ORGANIQUES



---

## CHAPITRE II :

### ETUDE DE L'ORIENTATION DE RADICAUX ORGANIQUES.

---

#### I. INTRODUCTION

Les données cristallographiques publiées sur le Photosystème II sont, pour l'instant, limitées à une structure par diffraction d'électrons avec une résolution de 8 Å<sup>1</sup>. Cette résolution est insuffisante pour déterminer la position des cofacteurs principaux intervenant dans le transfert d'électron. Cependant, un modèle structural relativement détaillé est apparu pour les parties principales du PS II basé sur des mesures spectroscopiques comparatives entre le PS II et les centres réactionnels des bactéries pourpres photosynthétiques<sup>2</sup>, les comparaisons de séquences des acides aminés<sup>3</sup>, des études de mutagenèse dirigée<sup>4,5</sup>, des études biochimiques<sup>6,7</sup> et des modélisations moléculaires sur ordinateur<sup>8,9</sup>. Des mesures spectroscopiques, en particulier de RPE, ont fourni des informations structurales précises qui remplacent progressivement les hypothèses du modèle<sup>10-17</sup>.

En utilisant la résolution inhérente de la RPE à champ intense vis-à-vis de l'anisotropie du facteur g en combinaison avec des échantillons orientés à une dimension, il est possible de déterminer directement l'orientation d'un radical par rapport à l'axe d'orientation. Cette méthode a été appliquée avec succès pour Y<sub>D</sub><sup>•14</sup>. Dans l'étude présentée ici, des données de meilleure résolution pour ce radical ont été obtenues, à la fois en solution et pour des échantillons orientés. Nous avons également obtenu les spectres en solution et dans des échantillons orientés pour la plastoquinone Q<sub>A</sub> et la phéophytine-a du PS II. L'orientation de ces cofacteurs par rapport à la membrane photosynthétique a été déterminée. Dans le cas de la phéophytine, cette étude aboutit à une proposition pour l'orientation des axes principaux du tenseur g par rapport à la molécule.

## II. PREPARATION DES ECHANTILLONS ORIENTES

Les échantillons orientés ont été préparés dans une pièce éclairée par une lumière verte peu intense. Les membranes de PS II ont été centrifugées puis resuspendues dans une quantité minimale de tampon pour obtenir une solution homogène concentrée. Cette solution légèrement pâteuse est étalée sur les deux faces de films de plastique (films transparents pour photocopieur, 3M N° PP2500) au moyen d'un pinceau fin. Ces films sont maintenus au moyen d'un petit cadre en plastique. Ces cadres ont ensuite été placés à l'intérieur d'un dessiccateur contenant une solution saturée de sulfate de zinc pour maintenir un taux d'humidité constant de 90%. Les films ont été laissés dans le dessiccateur, placé à l'obscurité en chambre froide, jusqu'à ce que les films soient secs (en général entre 12 et 24 heures).

Après séchage, les films ont été découpés soit en bandes étroites d'environ 15 mm de long et placés à l'intérieur d'un tube RPE calibré (environ 10 bandes par tube) soit en carrés de 5 mm de côté et empilés dans un tube à fond plat en polycarbonate de 10 mm de diamètre. Pour maintenir les films immobiles à l'intérieur des tubes, ils ont été recouverts d'une solution tampon et immédiatement congelés à l'obscurité. Dans le cas des échantillons destinés à l'étude de l'orientation de la semiquinone  $Q_A$ , les échantillons ont été préréduits chimiquement en utilisant du dithionite de sodium avant séchage. Le tampon utilisé pour recouvrir les films à l'intérieur des tubes contenait également du dithionite de sodium. Après détermination de l'orientation de la semiquinone, les tubes contenant les échantillons orientés ont été placés sous atmosphère d'argon dans un bain à 288 K et éclairés à cette température pendant 12 minutes afin de réduire à deux électrons la quinone et de photo-accumuler la phéophytine. Après éclaircissement les échantillons ont été immédiatement congelés à l'obscurité et conservés dans l'azote liquide jusqu'à utilisation.

## III. SPECTRES RPE DANS LE CAS DES POUDRES ET DES SOLUTIONS GELEES

L'interaction Zeeman électronique entre le champ magnétique appliqué,  $\mathbf{H}_0$ , et le spin  $\mathbf{S}$  d'un radical organique est décrite par l'Hamiltonien suivant:

$$\hat{H} = \beta(\mathbf{H}_0 \cdot \tilde{\mathbf{g}} \cdot \hat{\mathbf{S}}) \quad (\text{Eq. 2.1})$$

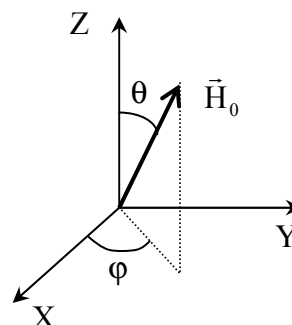
où  $\beta$  est la valeur absolue du magnéton de Bohr et  $\mathbf{g}$  représente le tenseur associé au radical. Dans le repère principal lié au tenseur  $\mathbf{g}$ , repère dans lequel le tenseur est diagonal, cette expression devient:

$$\hat{H} = \beta(g_X H_{0X} \hat{S}_X + g_Y H_{0Y} \hat{S}_Y + g_Z H_{0Z} \hat{S}_Z) = g\beta H_0 \hat{S}_Z \quad (\text{Eq. 2.2})$$

où X, Y et Z dénotent les coordonnées dans le repère principal lié au tenseur  $\mathbf{g}$  et X', Y' et Z' dénotent les coordonnées dans le repère du laboratoire pour lequel l'axe Z' coïncide avec la direction du champ magnétique appliqué. Les valeurs  $g_X$ ,  $g_Y$  et  $g_Z$  sont les valeurs principales du tenseur  $\mathbf{g}$  et  $g$  est la valeur intervenant dans l'équation de résonance:

$$h\nu = g\beta H_0 \quad (\text{Eq. 2.3})$$

Pour un radical organique, on choisit par convention:  $g_X > g_Y > g_Z$ .  $h$  est la constante de Planck et  $\nu$  la fréquence à laquelle est enregistré le spectre.



**Schéma 1.** Coordonnées sphériques définissant le champ magnétique dans un repère cartésien.

En utilisant les coordonnées sphériques pour le champ magnétique dans le repère principal lié au tenseur  $\mathbf{g}$ , la valeur de  $g$  pour la résonance s'écrit:

$$g = \sqrt{g_X^2 \sin^2\theta \cos^2\phi + g_Y^2 \sin^2\theta \sin^2\phi + g_Z^2 \cos^2\theta} \quad (\text{Eq. 2.4})$$

où  $\theta$  représente l'angle entre le champ magnétique et l'axe Z du repère principal et  $\phi$  représente l'angle entre l'axe X du repère principal et la projection du champ magnétique sur le plan (X, Y) (voir schéma 1). Cette équation est celle d'un ellipsoïde de révolution. Dans le cas d'une poudre ou d'une solution gelée, le champ magnétique peut prendre toutes les orientations possibles dans le repère principal et le spectre d'absorption RPE qui en résulte est la somme du signal RPE correspondant à chacune des orientations. Ce spectre, appelé spectre de poudre, est représenté sur la figure 1 ainsi que sa dérivée première qui est la forme sous laquelle les spectres RPE sont enregistrés conventionnellement en modulant l'amplitude du champ exciteur.

La valeur de  $g$  pour la résonance dépend donc de l'orientation du champ magnétique par rapport aux axes moléculaires (axes principaux du tenseur  $g$ ) ce qui permet de sélectionner les orientations des molécules lorsque la valeur du champ appliqué est suffisante pour résoudre l'anisotropie de l'interaction Zeeman

(condition du champ intense).

Le schéma du haut sur la figure 1 représente les traces sur l'ellipsoïde de résonance

des orientations du champ magnétique conduisant à une résonance pour les valeurs principales  $g_x$ ,  $g_y$  et  $g_z$ . La

résonance à  $g_x$  est obtenue uniquement pour les molécules dont l'axe  $g_x$  est aligné selon la direction du

champ magnétique appliqué. De même, la résonance à  $g_z$  est obtenue uniquement pour les molécules dont l'axe  $g_z$  est aligné selon la direction du

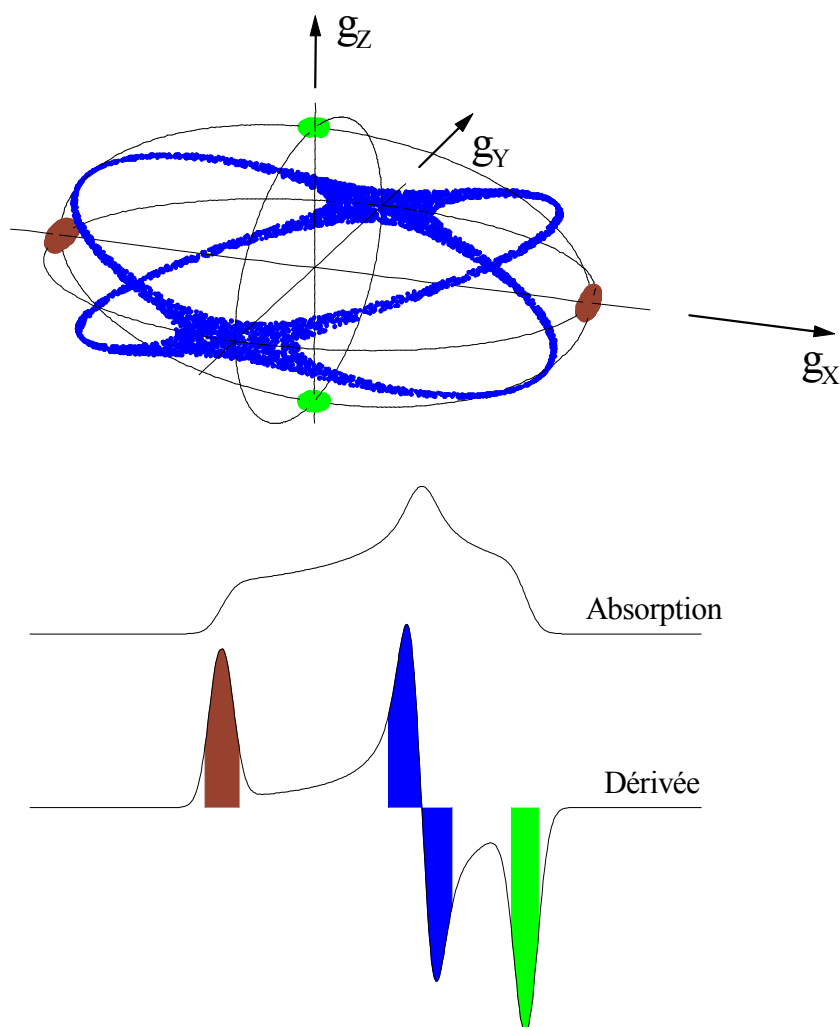
champ magnétique appliqué. Pour obtenir la résonance à  $g_y$ , il y a une infinité de

possibilités: toutes les molécules pour lesquelles le champ magnétique coupe l'ellipsoïde de résonance

suivant un cercle de rayon  $g_y$  vont être en résonance à cette valeur. La valeur du champ magnétique appliqué permet donc de

sélectionner, au niveau de la résonance, les molécules dans une orientation définie. Cette propriété

géométrique inhérente au facteur  $g$  est utilisée ici pour déterminer l'orientation de radicaux

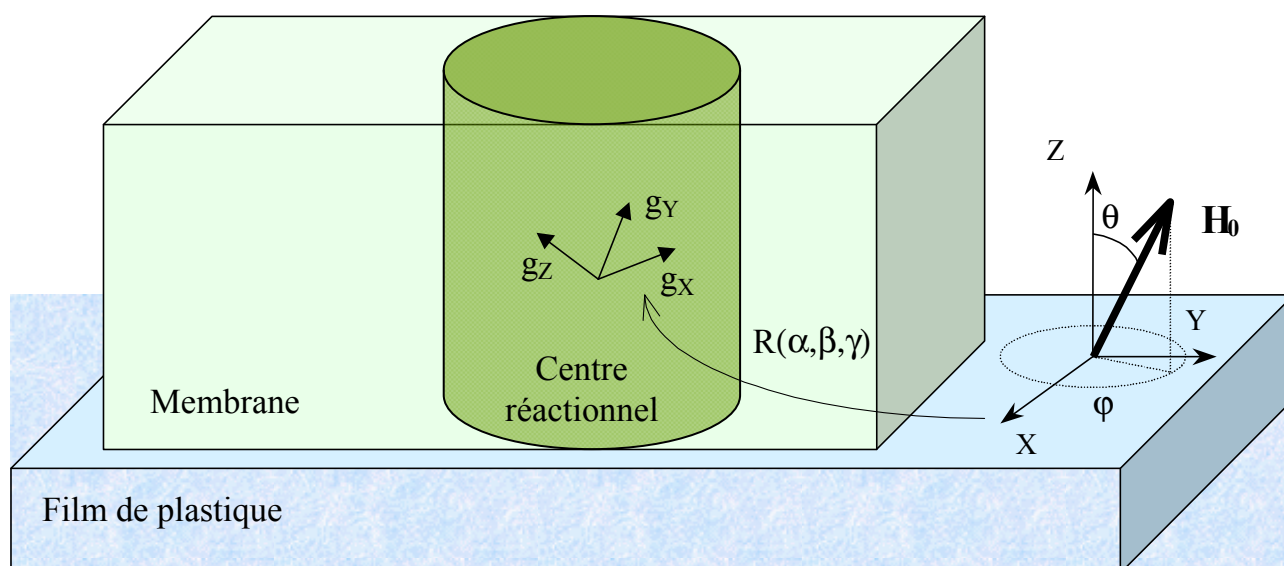


**Figure 1.** Représentation schématique de l'ellipsoïde de résonance. Les traces des orientations du champ magnétique donnant une résonance pour les valeurs principales du tenseur  $g$  sont représentées. Les spectres de poudre RPE (absorption et dérivée première) sont représentés en dessous.

La valeur du champ magnétique appliqué permet donc de sélectionner, au niveau de la résonance, les molécules dans une orientation définie. Cette propriété géométrique inhérente au facteur  $g$  est utilisée ici pour déterminer l'orientation de radicaux

organiques dans la membrane photosynthétique au moyen d'échantillons orientés dans une dimension.

#### IV. TRAITEMENT DES DONNEES RPE POUR LES ECHANTILLONS ORIENTES A UNE DIMENSION



**Schéma 2.** Représentation schématique d'un morceau de membrane orienté sur un film de plastique. Le repère intermédiaire de référence (X, Y, Z) est lié au film de plastique. Les coordonnées du champ magnétique appliqué  $H_0$  sont exprimées dans ce repère au moyen des angles  $\theta$  et  $\varphi$ . Le repère intermédiaire de référence est relié au système d'axes moléculaires par la transformation  $R(\alpha, \beta, \gamma)$

Pour calculer le champ de résonance d'un spin, les composantes du champ magnétique appliqué doivent être connues dans le système d'axes du tenseur  $g$ . En utilisant les coordonnées sphériques, cette orientation est définie par deux angles. Dans le cas d'une poudre ou d'une solution gelée, ces angles peuvent prendre toutes les valeurs possibles. Dans le cas d'un échantillon orienté dans une dimension, ces valeurs sont restreintes et dépendent de la direction d'orientation. Pour faciliter le calcul des spectres RPE pour les échantillons orientés dans une dimension, un repère intermédiaire de référence est utilisé (voir schéma 2). Ce repère est lié à la feuille de plastique sur laquelle sont orientés les fragments de membrane contenant les protéines. L'axe Z du repère intermédiaire est perpendiculaire à la feuille de plastique et correspond à la direction d'orientation des échantillons. Les axes X et Y sont perpendiculaires à l'axe Z et contenus dans la feuille de plastique. Les coordonnées du champ magnétique sont d'abord exprimées dans le repère intermédiaire, puis dans le système d'axes du tenseur  $g$  au moyen d'une transformation d'Euler.

Nous adoptons ici les conventions de signe et la définition des angles d'Euler de Rose<sup>18</sup> : la transformation d'Euler qui permet de transformer un repère en un autre peut se décomposer en un produit de trois rotations d'angle  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ .

$$\mathbf{R}(\alpha, \beta, \gamma) = \mathbf{R}_{Z_2}(\gamma) \mathbf{R}_{Y_1}(\beta) \mathbf{R}_Z(\alpha) \quad (\text{Eq. 2.5})$$

La première rotation appliquée,  $\mathbf{R}_Z(\alpha)$ , est une rotation d'angle  $\alpha$  autour de l'axe Z du repère initial. Elle est suivie d'une rotation d'angle  $\beta$  autour du nouvel axe  $Y_1$  et enfin d'une rotation d'angle  $\gamma$  autour de l'axe  $Z_2$  final. Sous forme matricielle,  $\mathbf{R}(\alpha, \beta, \gamma)$  s'écrit:

$$\mathbf{R}(\alpha, \beta, \gamma) = \begin{pmatrix} \cos \alpha \cos \beta \cos \gamma - \sin \alpha \sin \gamma & \sin \alpha \cos \beta \cos \gamma + \cos \alpha \sin \gamma & -\sin \beta \cos \gamma \\ -\cos \alpha \cos \beta \sin \gamma - \sin \alpha \cos \gamma & -\sin \alpha \cos \beta \sin \gamma + \cos \alpha \cos \gamma & \sin \beta \sin \gamma \\ \cos \alpha \sin \beta & \sin \alpha \sin \beta & \cos \beta \end{pmatrix}$$

Ce produit de rotations peut être identiquement exprimé en terme de rotations par rapport aux axes du repère d'origine, c'est-à-dire du repère de référence:

$$\mathbf{R}(\alpha, \beta, \gamma) = \mathbf{R}_Z(\alpha) \mathbf{R}_Y(\beta) \mathbf{R}_Z(\gamma) \quad (\text{Eq. 2.6})$$

Dans ce cas la première rotation appliquée est la rotation d'angle  $\gamma$  autour de l'axe Z du repère de référence. La transformation globale  $\mathbf{R}(\alpha, \beta, \gamma)$  est la même dans les deux cas. Elle permet de transformer le repère de référence dans le repère lié au tenseur g.

$$\begin{pmatrix} X \\ Y \\ Z \end{pmatrix} = \mathbf{R}^{-1}(\alpha, \beta, \gamma) \begin{pmatrix} X_G \\ Y_G \\ Z_G \end{pmatrix} = {}^t\mathbf{R}(\alpha, \beta, \gamma) \begin{pmatrix} X_G \\ Y_G \\ Z_G \end{pmatrix} \quad (\text{Eq. 2.7})$$

Les composantes du champ magnétique dans le repère de référence sont définies au moyen des coordonnées sphériques:

$$\mathbf{H}_{\text{REF}} = H_0 (\cos \varphi \sin \theta \mathbf{X} + \sin \varphi \sin \theta \mathbf{Y} + \cos \theta \mathbf{Z}) \quad (\text{Eq. 2.8})$$

où  $H_0$  représente l'amplitude du champ magnétique appliqué,  $\theta$  est l'angle entre le champ magnétique et l'axe Z du repère de référence et  $\varphi$  est l'angle entre l'axe X du repère de référence et la projection du champ magnétique sur le plan (X, Y) (voir schémas 1 et 2).

Les coordonnées du champ magnétique dans le système d'axes du tenseur g sont obtenues en combinant les équations (2.7) et (2.8):

$$\begin{aligned} (1/H_0)\mathbf{H} &= [\cos \varphi \sin \theta (\cos \alpha \cos \beta \cos \gamma - \sin \alpha \sin \gamma) + \sin \varphi \sin \theta (\sin \alpha \cos \beta \cos \gamma + \cos \alpha \sin \gamma) - \sin \beta \cos \gamma \cos \theta] \mathbf{X}_G \\ &+ [\cos \varphi \sin \theta (-\cos \alpha \cos \beta \sin \gamma - \sin \alpha \cos \gamma) + \sin \varphi \sin \theta (-\sin \alpha \cos \beta \sin \gamma + \cos \alpha \cos \gamma) + \sin \beta \sin \gamma \cos \theta] \mathbf{Y}_G \\ &+ [\cos \varphi \sin \theta (\cos \alpha \sin \beta) + \sin \varphi \sin \theta (\sin \alpha \sin \beta) + \cos \theta \cos \beta] \mathbf{Z}_G \\ &= l\mathbf{X}_G + m\mathbf{Y}_G + n\mathbf{Z}_G \end{aligned}$$

$l$ ,  $m$  et  $n$  sont les directions cosinus du champ magnétique dans le système d'axes du tenseur g et permettent de calculer la valeur de g pour la résonance:

$$g = \sqrt{g_x^2 l^2 + g_y^2 m^2 + g_z^2 n^2} \quad (\text{Eq. 2.9})$$

Dans le cas des échantillons orientés, l'angle  $\theta$  est constant au cours de l'expérience et fixé par l'expérimentateur. L'angle  $\varphi$  peut prendre toutes les valeurs entre 0 et  $360^\circ$  car l'échantillon n'est pas orienté dans le plan des feuilles de plastique. Cet angle est moyenné lors des simulations et la conséquence est que les spectres obtenus sont indépendants de l'angle d'Euler  $\alpha$  qui correspond à une rotation autour de l'axe Z du repère de référence. Dans le cas particulier où le champ magnétique est aligné avec cet axe d'orientation, l'angle  $\theta$  est nul et l'équation 2.9 ci-dessus devient:

$$g = \sqrt{g_x^2 \sin^2 \beta \cos^2 \gamma + g_y^2 \sin^2 \beta \sin^2 \gamma + g_z^2 \cos^2 \beta} \quad (\text{Eq. 2.10})$$

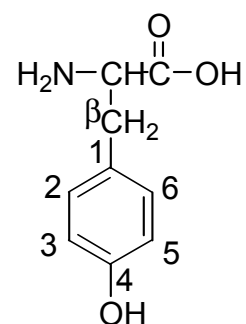
Dans ce cas, la valeur de g pour la résonance est indépendante de  $\varphi$ . Les angles  $\beta$  et  $\gamma$  étant uniques, g a également une valeur unique. Le spectre RPE est identique à celui obtenu pour un monocristal dans une orientation donnée, il est constitué d'une seule ligne.

Le calcul des spectres RPE pour des échantillons orientés dans une seule direction est déterminé par trois angles indépendants,  $\theta$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  et les valeurs principales du tenseur g pour le radical étudié. Si les feuilles de plastique ne sont pas parfaitement parallèles entre elles ou si les films ne sont pas correctement positionnés dans le champ magnétique cela se traduit par une incertitude sur l'angle  $\theta$ .

Par contre, si le tenseur  $g$  du radical étudié n'a pas une position rigoureusement définie par rapport à la normale aux films de plastique, cela se traduit par une distribution pour chacun des angles  $\beta$  et  $\gamma$ . Une telle distribution provient soit d'un désordre local au niveau du radical à l'intérieur de la protéine soit d'un mauvais alignement des morceaux de membranes sur les films de plastique. L'expérience de RPE ne permet pas *a priori* de faire la distinction entre ces deux types de désordre. Le traitement des données RPE pour des échantillons orientés a été décrit par Blum et collaborateurs<sup>19</sup>. Cependant, l'analyse de la distribution mosaïque est incorrecte dans leur étude. Les auteurs affirment qu'une distribution du champ magnétique par rapport à la normale aux films est équivalente à la distribution du tenseur  $g$  par rapport à la normale aux films ce qui n'est pas le cas en général. La distribution mosaïque conduit à la distribution de deux angles ( $\beta$  et  $\gamma$ ).

## V. TYROSINE D

Les spectres RPE à 190 et 285 GHz du radical tyrosyle  $Y_D^\bullet$  du PS II enregistrés en solution gelée sont représentés sur la figure 3. L'anisotropie de l'interaction Zeeman est clairement résolue à ces deux fréquences et le couplage hyperfin, dû principalement aux protons en positions ortho et  $\beta$  du noyau phénolique, est visible sur chaque portion du spectre correspondant aux valeurs principales du tenseur  $g$ . Des simulations ont été faites afin d'obtenir des valeurs de  $g$  précises pour le radical. Ces valeurs sont nécessaires pour l'analyse des données enregistrées sur les échantillons orientés. Pour les



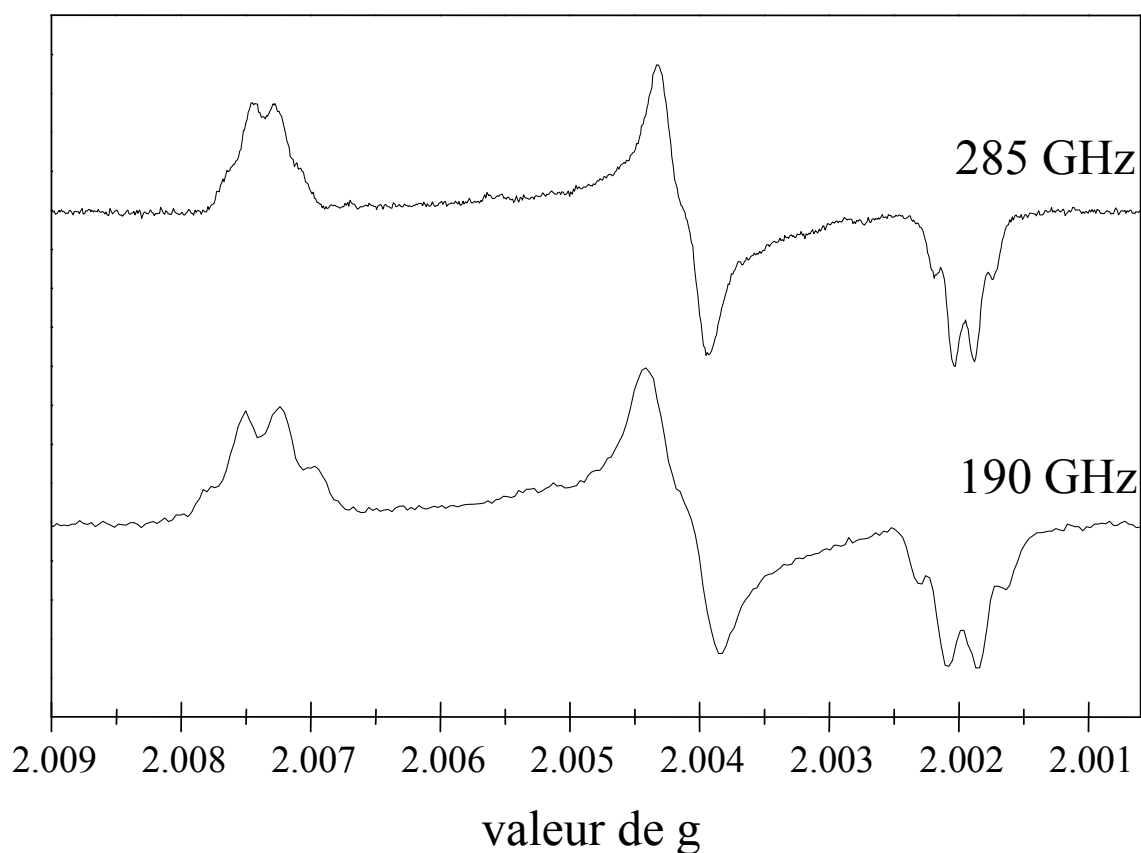
**Figure 2. Tyrosine :**  
structure et numérotation  
du squelette carboné.

simulations, le modèle suivant a été utilisé: pour l'interaction Zeeman un tenseur  $g$  anisotrope est utilisé; pour les interactions hyperfines, le même tenseur anisotrope est utilisé pour chacun des protons 3 et 5 du noyau phénolique. L'axe  $z$  de ce tenseur est supposé être parallèle à l'axe  $g_z$ . L'angle entre les axes  $a_x$  et  $g_x$  est un paramètre variable au cours des simulations. Un tenseur hyperfin anisotrope est utilisé pour chacun des protons  $\beta$ . Les axes de ces tenseurs sont supposés être parallèles aux axes principaux du tenseur  $g$ . Un couplage isotrope fixe de 5 MHz est inclus pour chacun des protons 2 et 6 du noyau phénolique. Cela fait un total de 13 paramètres variables. Les valeurs finales de ces paramètres obtenus par simulation sont reportées dans la table 1. Ces valeurs sont en accord avec celles obtenues par des études par ENDOR<sup>20,21</sup> et ESEEM<sup>22</sup> déjà publiées et qui sont reportées dans la table 1 pour comparaison.



Valeurs de g		$g_x=2.00756$ (dist. $3.6 \cdot 10^{-5}$ )	$g_y=2.00432$	$g_z=2.00215$	
Valeurs des couplages hyperfins (en MHz)		Hoganson et al. <sup>20</sup>	Warncke et al. <sup>22</sup>	Rigby et al. <sup>21</sup>	Ce travail
$A_{3,5}$	X	29.4	25.4	26	24
	Y	8.99	7.2	8	3
	Z	19.6	19.5	20	19
$A_{2,6}$	X	4.7	-	4.4	5
	Y	13.1	-	7.2	5
	Z	1.1	-	-	5
$A_{\beta_1}$	X	21.6	20.2	27.2	31
	Y	21.6	20.2	27.2	28
	Z	23.3	29.3	31.5	27
$A_{\beta_2}$	X	< 7	5.2	4.6	7
	Y	< 7	5.2	4.6	9
	Z	< 7	14.3	9.75	3
$\Phi_{3,5}$		22°	-	-	26°

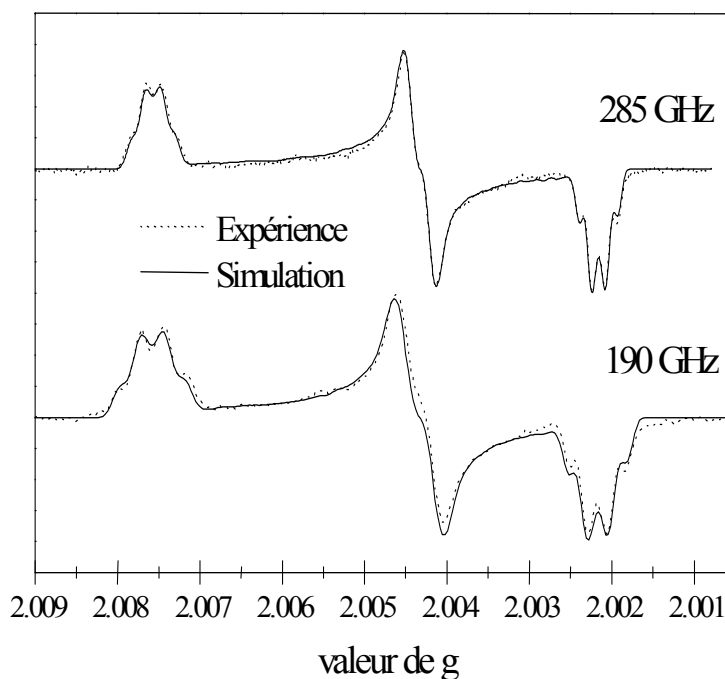
**Table 1.** Paramètres des simulations RPE pour les spectres de poudre de  $Y_D^\bullet$ .



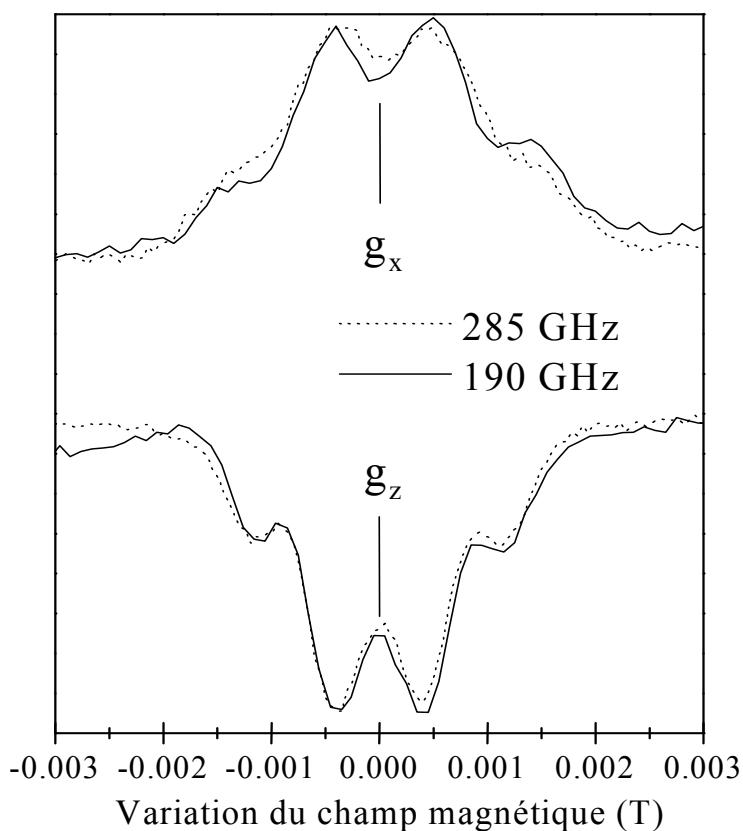
**Figure 3.** Spectres de  $Y_D^\bullet$  enregistrés pour une préparation membranaire de PS II en solution gelée à pH 6.0. Conditions expérimentales :  $\nu_{mw}=285.363$  GHz et  $\nu_{mw}=190.060$  GHz, amplitude de modulation : 0.33 mT pour les deux spectres, température 4.2 K.

Les spectres simulés sont représentés sur la figure 4 avec les spectres expérimentaux.

Une comparaison détaillée des spectres à 285 et 190 GHz permet de tirer certaines conclusions sur l'environnement du radical. Les portions des spectres expérimentaux aux deux fréquences correspondant aux valeurs principales  $g_x$  et  $g_z$  sont représentées avec la même échelle de champ sur la figure 5. La partie correspondant à  $g_z$  est exactement superposable pour les deux fréquences. En comparaison, la partie correspondant à  $g_x$  accuse une légère perte de résolution à 285 GHz par rapport à 190 GHz. Le couplage hyperfin étant indépendant du champ magnétique, ce faible élargissement est attribué au 'g-strain'. Pour en tenir compte, une distribution gaussienne de mi-largeur à mi-hauteur équivalent à  $3.6 \cdot 10^{-5}$  en valeur de  $g$  a été utilisée pour  $g_x$  dans les simulations. Cette valeur très faible indique l'absence quasi totale de distribution dans l'environnement électrostatique du radical, autrement dit, le radical se trouve dans un environnement très stable et très bien

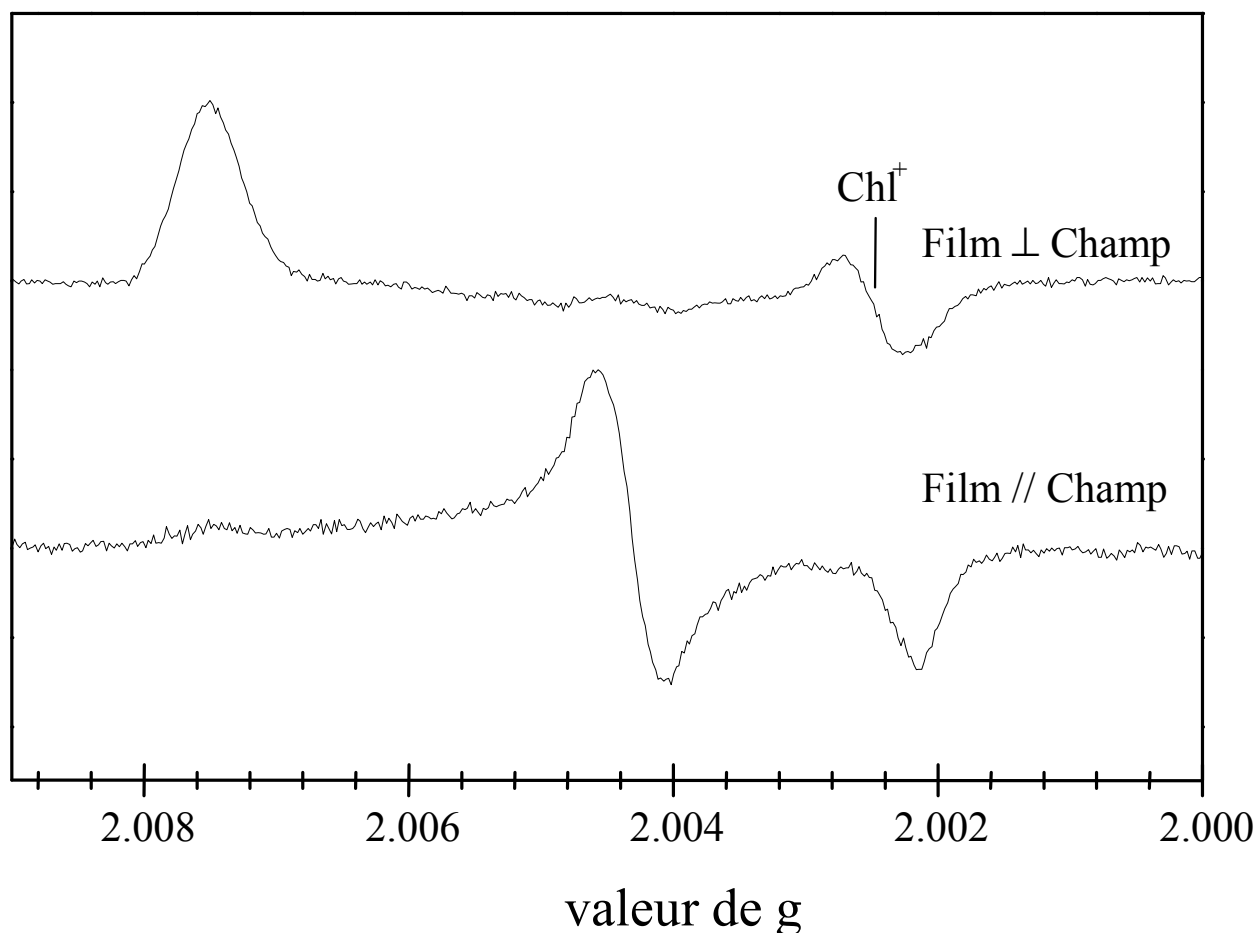


**Figure 4.** Spectres expérimentaux et simulés de  $Y_D^\bullet$  en solution gelée. Les conditions expérimentales sont données dans la légende de la figure 3. Les paramètres pour les simulations sont listés dans la table 1.



**Figure 5.** Régions des spectres expérimentaux de  $Y_D^\bullet$  correspondant aux valeurs principales  $g_x$  et  $g_z$  représentés sur une échelle de champ. Les conditions expérimentales sont indiqués dans la légende de la figure 3.

défini. Ceci est en accord direct avec des études de RPE pulsée qui ont montré que le radical tyrosyle stable du PS II a une structure très rigide<sup>22</sup>. Dans le cas des échantillons orientés, les spectres RPE obtenus sont représentés sur la figure 6. Les spectres ont été enregistrés pour deux orientations distinctes, parallèle et perpendiculaire, du champ magnétique appliqué par rapport à la normale des feuilles de plastique. La modulation en champ étant de 2 mT pour ces spectres, la structure hyperfine n'est pas résolue comme dans le cas des spectres en solution.



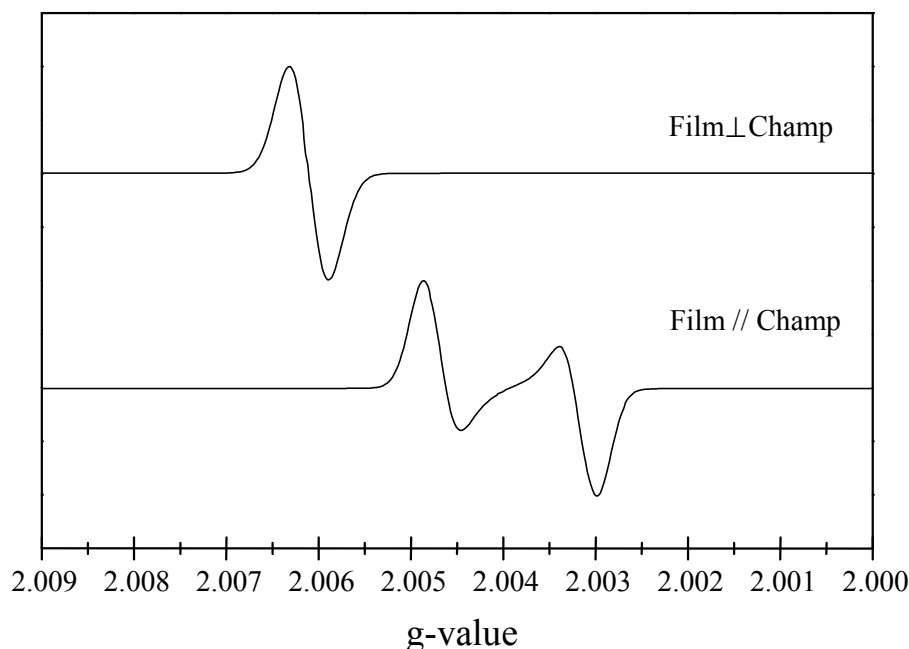
**Figure 6.** Spectre RPE haut champ pour des membranes de PS II orientées à une dimension. Conditions expérimentales :  $\nu_{mw}=284.804$  GHz (spectre du haut) et  $\nu_{mw}=284.940$  GHz (spectre du bas), amplitude de modulation 2 mT, température 4.2 K. Le radical  $Chl^+$  dans le spectre du haut provient du fait que cet échantillon a été accidentellement exposé à la lumière à basse température.

Dans le cas où le champ magnétique est perpendiculaire aux feuilles de plastique, un signal prédominant vers  $g_x$  est observé. Ceci indique que, dans ce cas, le champ magnétique est pratiquement aligné avec la direction de la liaison carbonyle de la tyrosine qui correspond à la direction  $g_x$ . En d'autres termes, la liaison carbonyle est pratiquement perpendiculaire au plan des

feuilles de plastique. Les spectres expérimentaux pour chaque orientation ont été simulés simultanément. Les paramètres variables durant les simulations sont les angles d'Euler définissant l'orientation du radical à l'intérieur de la membrane photosynthétique.

Dans le cas d'une orientation parfaite, le spectre RPE devrait être représenté par une ligne unique dans le cas où le champ magnétique est perpendiculaire aux films de plastique (voir figure 7). Ceci n'est pas observé

expérimentalement. La valeur de  $g$  pour la résonance n'est donc pas unique contrairement à ce qui est attendu. Ceci est possible si le champ magnétique n'est pas

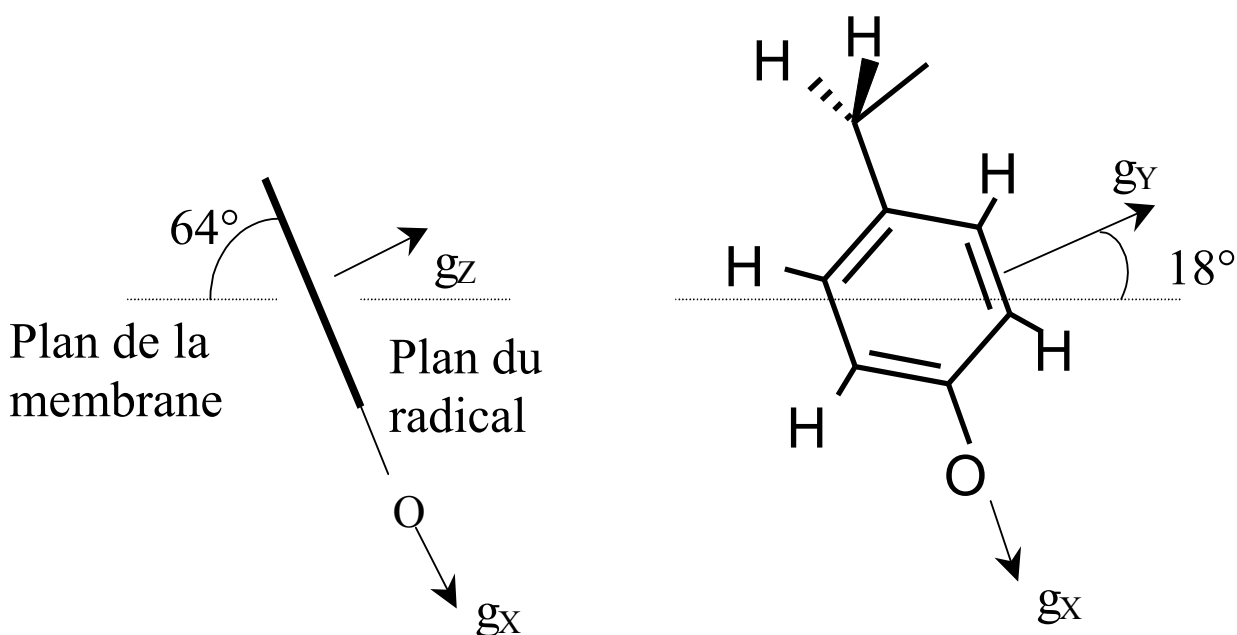


**Figure 7.** Spectres RPE calculés pour une orientation parfaite. Les paramètres des simulations sont ceux obtenus à partir des spectres orientés expérimentaux de  $Y_D^{\bullet}$  excepté aucune distribution pour les angles d'Euler n'a été utilisée.

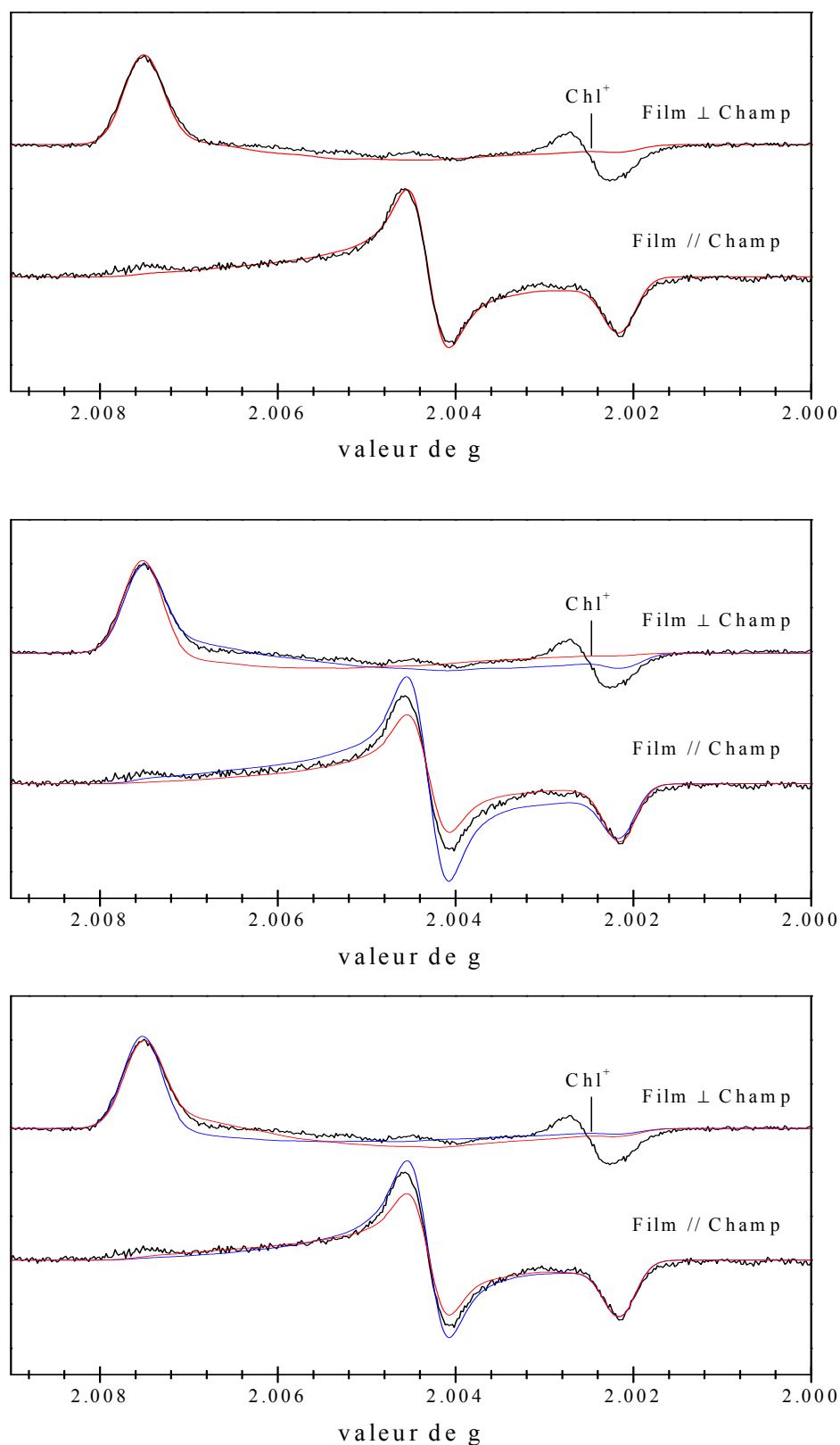
exactement perpendiculaire aux films. Cependant l'angle  $\theta$  est fixé lors de l'expérience et la marge d'erreur sur sa valeur ne suffit pas à expliquer l'importante déviation observée sur les spectres expérimentaux. La deuxième explication possible est que les valeurs des angles  $\beta$  et  $\gamma$  ne sont pas uniques. Afin de reproduire la forme du signal observé, il est nécessaire d'utiliser une distribution dans les angles d'Euler qui définissent l'orientation du tenseur  $g$ . Dans le cas présent une distribution gaussienne a été utilisée pour chacun des angles  $\beta$  et  $\gamma$ . La mi-largeur à mi-hauteur de cette distribution nécessaire pour obtenir des simulations satisfaisantes est de  $20^\circ$  pour chacun des angles. Dans le cas de la tyrosine D, des études d'ESEEM ont permis de montrer que la position du radical est très rigide dans la protéine<sup>22</sup>. Ce résultat est également confirmé par les spectres RPE haut champ en solution gelée (voir plus haut). L'origine de la distribution observée sur les angles d'Euler est donc attribuée à une distribution dans l'orientation des membranes sur les films de

plastique. Ceci est un résultat général dans les études d'orientation par RPE concernant des échantillons biologiques membranaires.

Les simulations effectuées sur les spectres des échantillons orientés (voir figure 8) ont donné des valeurs de  $64^\circ$  et  $18^\circ$  pour les angles d'Euler  $\beta$  et  $\gamma$  respectivement. Le plan de la tyrosine fait un angle de  $64^\circ$  avec le plan de la membrane et l'axe  $g_Y$  est orienté à  $18^\circ$  autour de l'axe  $g_Z$  par rapport au plan de la membrane (voir schéma 4). Bien que la distribution des angles d'Euler nécessaire pour obtenir des simulations correctes soit élevée, la précision sur la valeur des angles est bien meilleure. Des simulations effectuées en utilisant la même distribution mais en changeant l'un des angles d'Euler de  $5^\circ$  ne donnent pas des résultats satisfaisants (voir figure 8) et sont suffisamment distinctes pour pouvoir attribuer une marge d'erreur de  $\pm 5^\circ$  à la valeur des angles obtenus. Bien que l'alignement des morceaux de membrane sur les films de plastique ne soit pas très bon, cela n'empêche pas une détermination précise de l'orientation du radical à l'intérieur de la membrane photosynthétique.



**Schéma 4.** Représentation schématique de l'orientation de  $YD^\bullet$  par rapport à la membrane. A gauche, le plan de la membrane est perpendiculaire au plan de la figure ; à droite, le plan du noyau phénolique de la tyrosine correspond au plan de la figure.

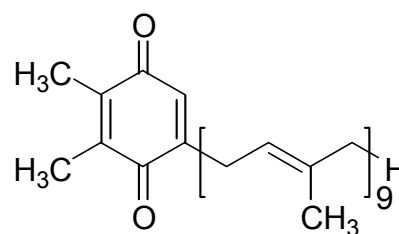


**Figure 8.** Simulations des spectres RPE pour les échantillons orientés. En haut : meilleures simulations obtenues, paramètres : les valeurs de  $g$  sont indiquées dans la table 1,  $\beta=64^\circ$  (distribution  $20^\circ$ ),  $\gamma=18^\circ$  (distribution  $20^\circ$ ). Graphes du milieu et du bas : simulations obtenues avec les mêmes paramètres mais en faisant varier les angles d'Euler de  $5^\circ$  ; milieu, spectre rouge :  $\beta=69^\circ$  et  $\gamma=17^\circ$ , spectre bleu :  $\beta=59^\circ$  et  $\gamma=17^\circ$  (distribution  $20^\circ$  dans tous les cas); bas, spectre rouge :  $\beta=64^\circ$  et  $\gamma=22^\circ$ , spectre bleu :  $\beta=64^\circ$  et  $\gamma=12^\circ$  (distribution  $20^\circ$  dans tous les cas).

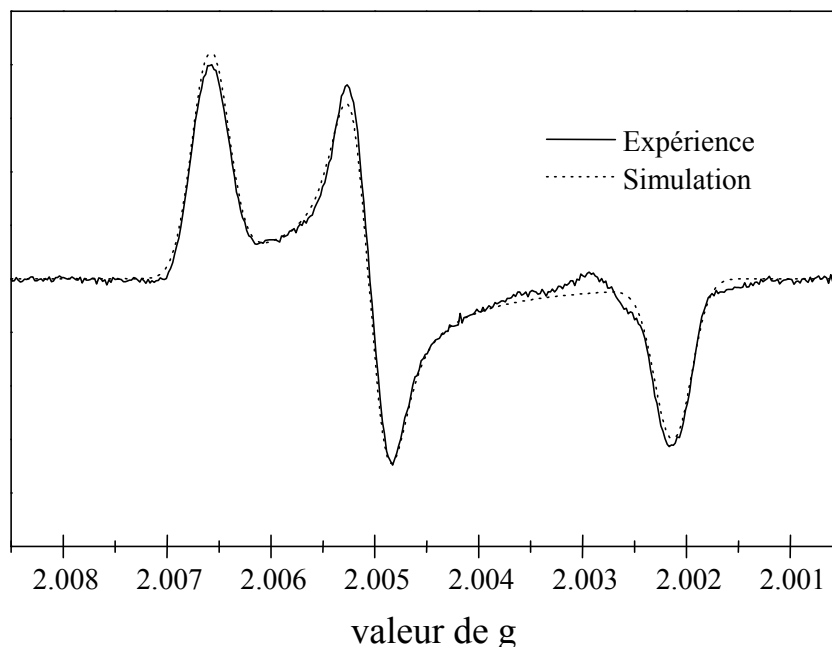
L'étude de l'orientation de la tyrosine D a été effectuée dans deux types de préparation: la préparation native qui est capable de dégager de l'oxygène et la préparation traitée au Tris-HCl qui permet de retirer le cluster à manganèse ainsi que les polypeptides extrinsèques de 17, 23 et 33 kDa. Dans les deux cas, les spectres obtenus sur les échantillons orientés sont semblables et conduisent à la même orientation pour le radical. La distribution sur les angles d'Euler est également la même dans les deux cas, l'enlèvement des polypeptides extrinsèques n'améliore donc pas sensiblement l'orientation des membranes sur les films.

## VI. SEMIQUINONE $Q_A$

Dans le système natif, le radical semiquinone, qui peut être généré soit par éclaircissement à 200 K soit par addition d'un réducteur chimique, est couplé au fer haut spin non hémique présent du côté accepteur de l'enzyme. Ce couplage résulte en un signal RPE très large avec une composante prédominante dans la région de  $g=1.9$ . Afin d'étudier directement le radical, il est possible de découpler le système soit en enlevant le fer par un traitement à pH 11<sup>23</sup> soit en le faisant basculer en bas spin  $S=0$  par un traitement au cyanure de potassium<sup>24</sup>. Le détail des préparations biochimiques se trouve en annexe. A moins d'une précision explicite, les résultats présentés ci-après ont été obtenus dans des échantillons de PS II préalablement traités au Tris-HCl pour lesquels le



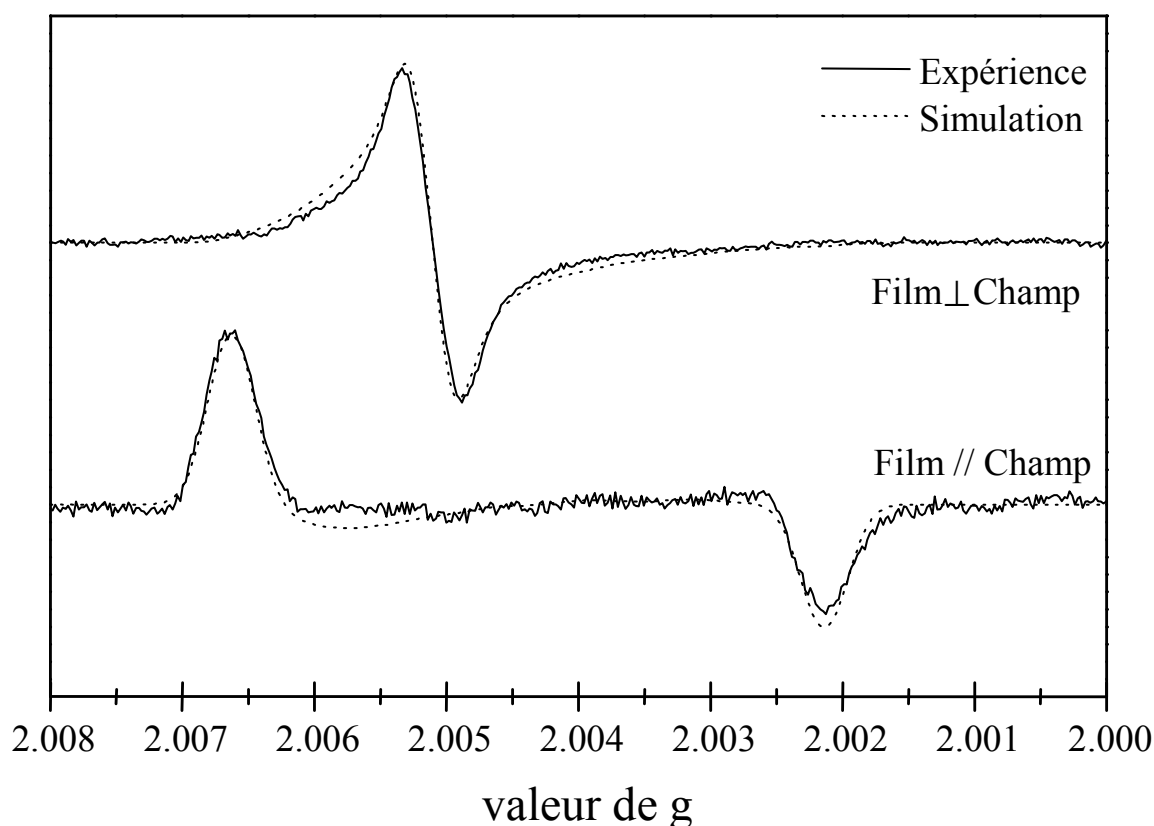
Structure de la plastoquinone-9



**Figure 9.** Spectre de la semiquinone  $Q_{A\bullet-}$  du PS II enregistré en solution gelée à pH 9.0. Conditions expérimentales :  $\nu_{mw}=285.090$  GHz, amplitude de modulation 2.0 mT, température 4.2 K. Paramètres de simulation : valeurs de  $g$  indiquées dans le texte.

fer non hémique a été enlevé par traitement à pH 11.

La figure 9 montre le spectre RPE obtenu à 285 GHz pour la semi-plastoquinone en solution gelée à pH 9.0 ainsi que le spectre simulé. Dans les deux cas le couplage hyperfin faible reste non résolu et ne contribue qu'à la largeur de raie du signal. Les valeurs principales obtenues pour le tenseur  $g$  sont 2.00661, 2.00506 et 2.00215. Ces valeurs sont comparables aux valeurs mesurées expérimentalement<sup>25</sup> et calculées<sup>26</sup> pour des modèles de plastoquinones. Cependant, l'anisotropie Zeeman totale est supérieure dans le cas du radical semiquinone du PS II par rapport à la mesure faite pour le radical dans une solution gelée d'alcool isopropylique<sup>25</sup>. Ceci indique que l'environnement du radical dans la protéine est davantage neutre électriquement que dans la solution d'alcool. Ce résultat est particulièrement intéressant à la lumière de ceux obtenus par ESEEM qui indiquent la proximité d'atomes d'azote qui sont des donneurs de liaison hydrogène potentiel dans la protéine<sup>27</sup>. Ces liaisons hydrogène contribuant à un environnement électropositif,



**Figure 10.** Spectres RPE haut champ obtenus pour la semiquinone  $Q_A^\bullet$  dans des échantillons orientés à une dimension. Conditions expérimentales :  $\nu_{mw}=285.636$  GHz, amplitude de modulation 2.0 mT, température 4.2 K. Paramètres des simulations : valeurs de  $g$  identiques à celles déterminées en solution,  $\beta=72^\circ$  (distribution  $20^\circ$ ),  $\gamma=111^\circ$  (distribution  $20^\circ$ ).



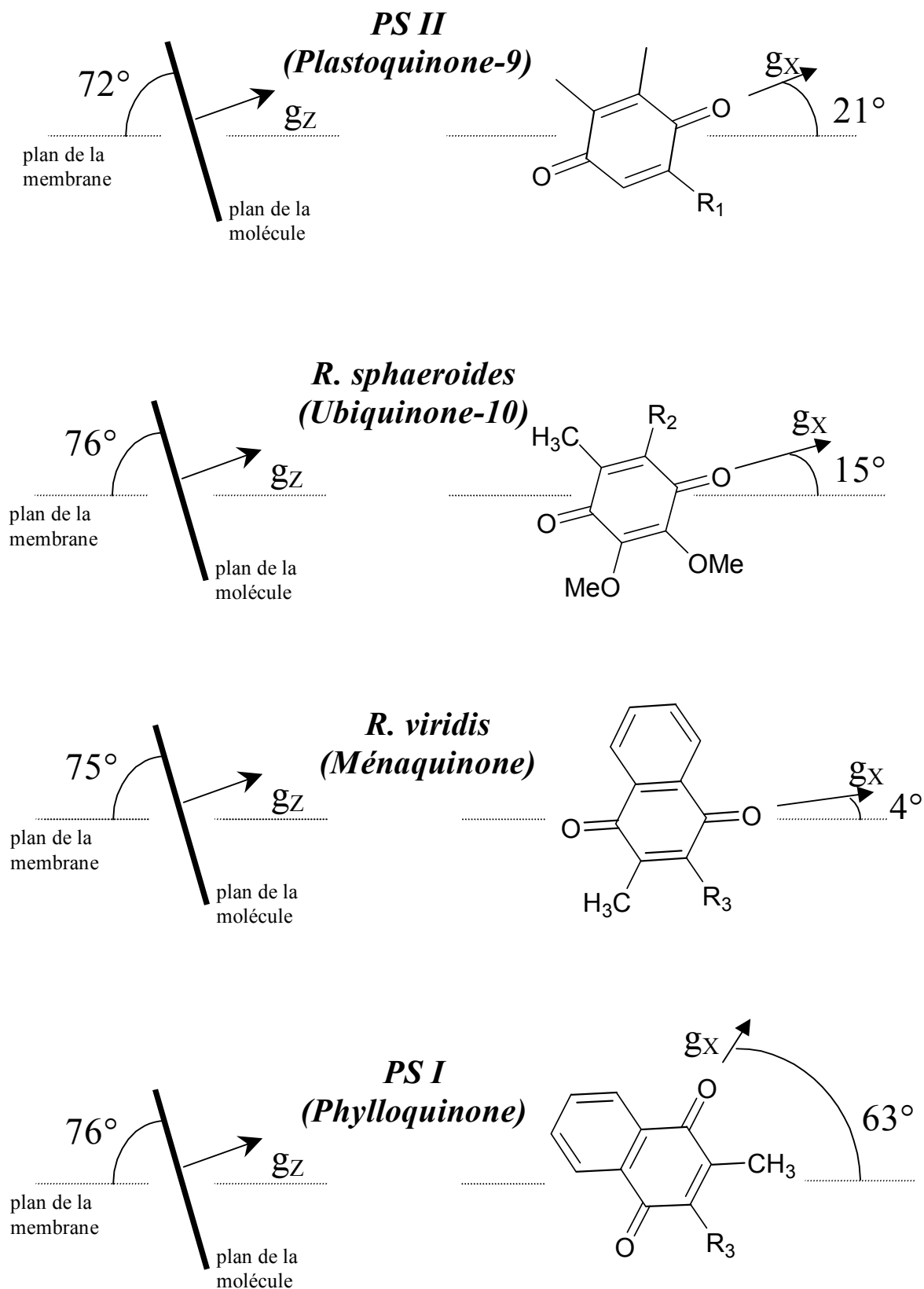
cela signifie que ces liaisons sont plus faibles dans le cas de la protéine comparé à la solution alcoolique ou bien que des contributions électro négatives compensent leurs effets.

Les spectres obtenus dans les échantillons orientés pour la semiquinone sont représentés sur la figure 10. Dans le cas où le champ magnétique est perpendiculaire aux feuilles de plastique, un signal prédominant vers  $g_Y$  est observé. Pour l'orientation complémentaire, où le champ magnétique est parallèle aux feuilles de plastique, la résonance est observée aux valeurs  $g_X$  et  $g_Z$ . La combinaison de ces deux résultats indiquent que la direction des liaisons carbonyles de la quinone est pratiquement parallèle aux feuilles de plastique. Les spectres simulés, représentés sur la figure 10, ont été obtenus pour les valeurs des angles d'Euler de  $72^\circ$  et  $111^\circ$  pour  $\beta$  et  $\gamma$  respectivement. Le plan de la quinone fait un angle de  $72^\circ \pm 5^\circ$  avec le plan de la membrane et la direction des liaisons carbonyles est orientée à  $21^\circ \pm 5^\circ$  autour de l'axe  $g_Z$  par rapport au plan de la membrane (voir schéma 5). De la même façon que dans le cas de la tyrosine D, une distribution des angles d'Euler était nécessaire pour obtenir des simulations satisfaisantes. La largeur à mi-hauteur de la distribution gaussienne utilisée est de  $20^\circ$  ce qui est identique à celle utilisée pour la tyrosine D. Ceci est en faveur de l'attribution du désordre au niveau de l'alignement des membranes sur les feuilles de plastique plutôt qu'au niveau local du radical étudié. Les mêmes résultats concernant l'orientation de la semiquinone ont été obtenus en utilisant des échantillons traités au cyanure de potassium, ce qui indique que cette orientation n'est pas affectée par la présence ou l'absence du fer non hémique.

Ces résultats obtenus sur l'accepteur  $Q_A$  du PS II représentent des informations structurales importantes puisque c'est la première fois que de tels résultats d'orientation sont disponibles pour la quinone dans le PS II. Il a été proposé que le côté accepteur du PS II est structurellement comparable à celui des bactéries pourpres. Il est donc intéressant de comparer l'orientation obtenue pour la quinone  $Q_A$  dans le PS II à celle obtenue par cristallographie dans les centres réactionnels photosynthétiques des bactéries pourpres. Les angles d'Euler définissant l'orientation de la quinone dans les centres bactériens ont été calculés à partir des coordonnées des structures aux rayons  $X^{28,29}$ . Pour effectuer ces calculs, la normale à la membrane photosynthétique a été modélisée par l'axe joignant le fer non hémique et le centre du segment joignant les ions magnésium des chlorophylles de la paire spéciale.

L'angle entre le plan de la quinone et celui de la membrane est de  $76^\circ$  pour *R. sphaeroides*<sup>29</sup> et de  $75^\circ$  pour *R. viridis*<sup>28</sup>. La valeur de  $72^\circ$  mesurée dans le cas du PS II est très comparable à ces

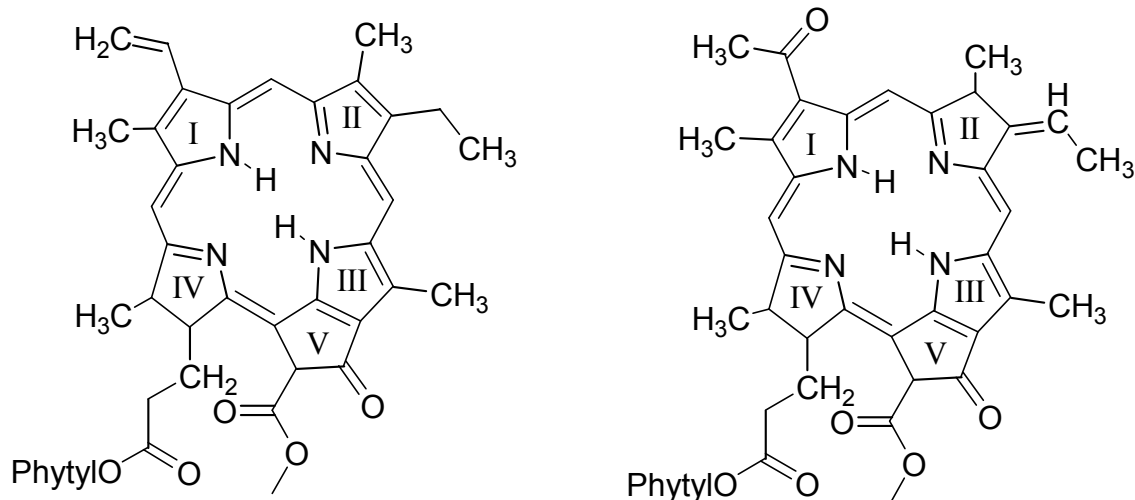
valeurs. Elle est également comparable à la valeur de  $76^\circ$  mesurée pour la phylloquinone du PS I<sup>30,31</sup>. Pour les trois types de photosystème, le plan de la molécule de quinone a une orientation similaire par rapport au plan de la membrane. Par contre, l'angle d'Euler  $\gamma$ , qui définit la position de



**Schéma 5.** Représentation schématique de l'orientation de QA ( $A_1$  pour PS I) dans différents centres réactionnels. Dessins de gauche, le plan de la membrane est perpendiculaire au plan de la feuille ; dessins de droite, le plan de la quinone correspond au plan de la figure.

la projection de la normale à la membrane sur le plan de la molécule et qui permet de calculer l'angle de rotation de l'axe des liaisons carbonyles autour de l'axe  $g_z$  par rapport à la membrane, varie d'un système à l'autre. Cet angle est de  $94^\circ$  pour *R. viridis* et de  $105^\circ$  pour *R. sphaeroides*. Il est légèrement plus grand dans le cas du PS II avec une valeur mesurée de  $111^\circ$  mais reste comparable au cas des bactéries pourpres alors que la valeur pour le PS I est nettement différente avec  $153^\circ$ <sup>30,31</sup>. Dans les bactéries pourpres,  $Q_A$  possède une liaison hydrogène sur chacun de ses carbonyles. L'une des liaisons hydrogène est donnée par un résidu histidine qui est également un ligand du fer non-hémique. La deuxième liaison provient d'un azote protoné appartenant au squelette protéique. Dans le cas du PS II des études par ESEEM ont conduit à proposer un schéma identique<sup>27,32</sup>. Les valeurs comparables mesurées pour les angles d'Euler sont également en accord avec une similarité structurale pour le côté accepteur du PS II et des bactéries pourpres photosynthétiques.

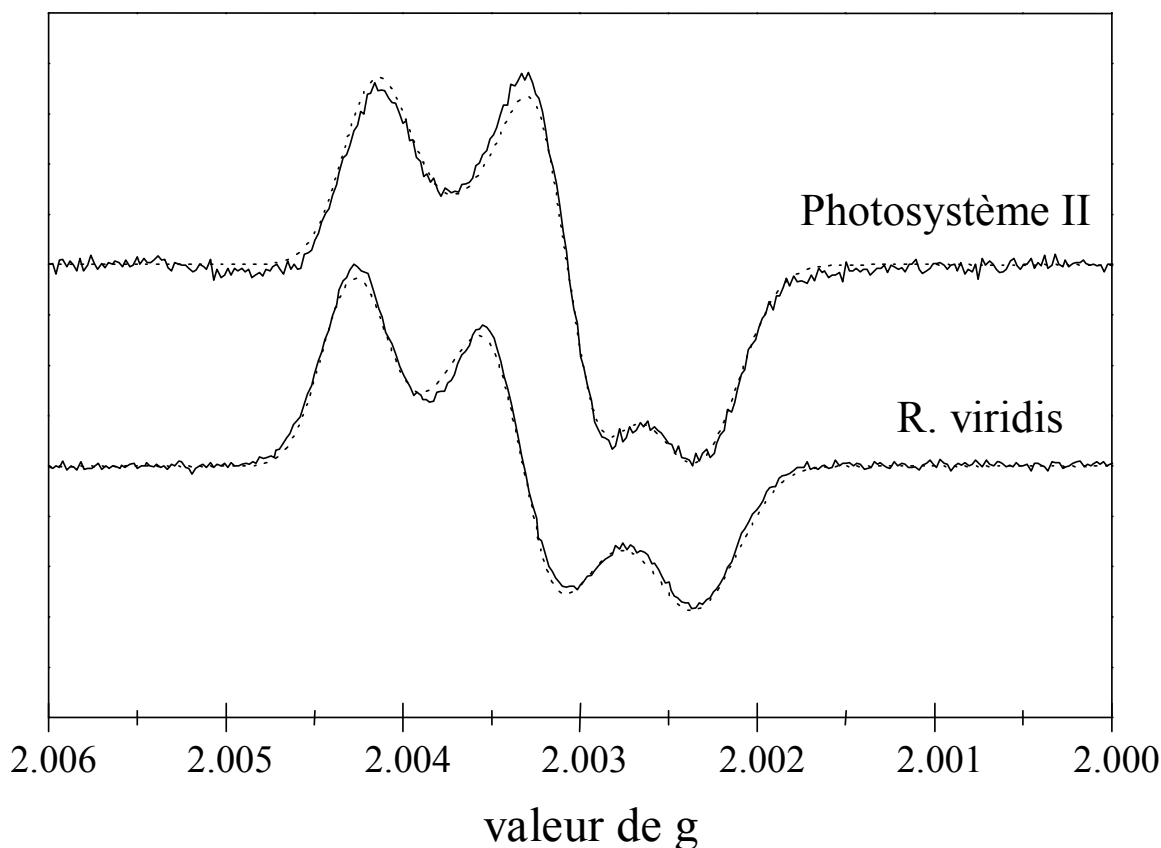
## VII. PHEOPHYTINE



Structures de la phéophytine-a (PS II), à gauche, et de la bactériophéophytine-b (*R. viridis*), à droite.

Dans des conditions de potentiel électrochimique très réductrices, il est possible de réduire à deux électrons la quinone  $Q_A$  par éclaircissement à 288 K<sup>33</sup>. Le radical anion de la phéophytine-*a* peut alors être photoaccumulé dans les centres réactionnels<sup>33</sup>. Le spectre RPE de ce radical anion enregistré en solution gelée à 285 GHz est représenté sur la figure 11. La faible anisotropie de ce radical est suffisante pour être résolue à cette fréquence. Le spectre calculé est également représenté sur la figure 11. Les valeurs principales obtenues pour le tenseur  $\mathbf{g}$  sont 2.00424, 2.00316 et

2.00237 pour  $g_x$ ,  $g_y$  et  $g_z$  respectivement. Pour comparaison, le spectre RPE de la bactériophéophytine-*b* a été enregistré à 285 GHz pour la bactérie pourpre *R. viridis*. Les valeurs de  $g$  obtenues dans ce cas sont 2.00437, 2.00340 et 2.00239. Les spectres expérimentaux et calculés sont représentés sur la figure 11. La valeur de  $g_z$  est la même dans les deux cas alors que les valeurs de  $g_x$  et  $g_y$  sont déplacées vers des valeurs de champ plus fortes ce qui résulte en une anisotropie Zeeman plus faible dans le cas du PS II par rapport à la bactériophéophytine de *R. viridis*.

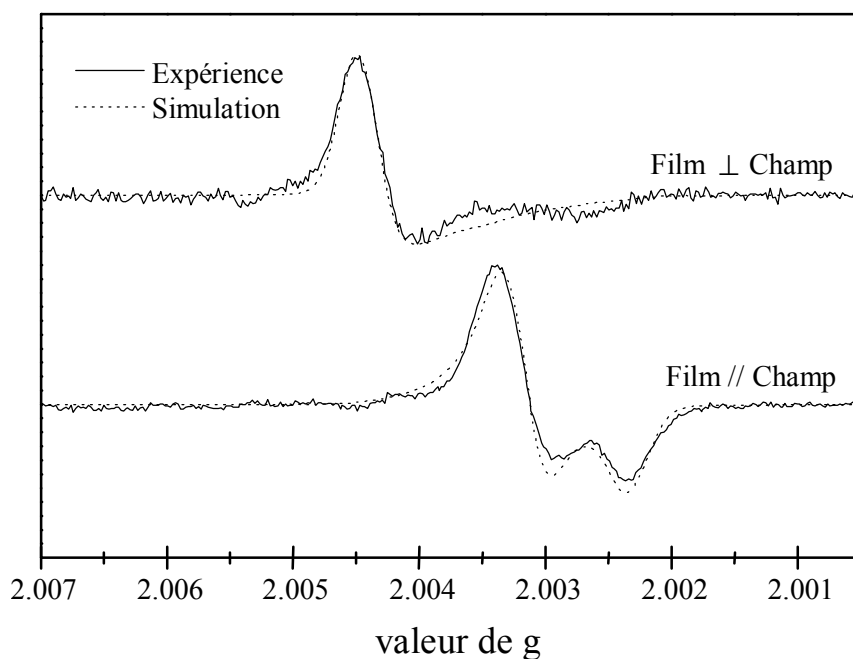


**Figure 11.** Spectres RPE haut champ obtenus pour le radical anion de la phéophytine-a (PS II) et de la bactériophéophytine-b (*R. viridis*). Trait plein : spectres expérimentaux ; trait pointillé : spectres calculés. Conditions expérimentales :  $\nu_{mw}=285.090$  GHz, amplitude de modulation 2.0 mT, température 4.2 K. Paramètre des simulations : valeurs de  $g$  comme indiqué dans le texte.

Stone a montré que la contribution dominante à l'anisotropie Zeeman dans le cas des radicaux organiques est due au couplage spin-orbite<sup>34-36</sup>. De plus, cette contribution est approximativement la moyenne des contributions de chaque atome ou groupe d'atomes constituant la molécule. Les coefficients intervenant dans cette moyenne dépendent de la densité de spin de l'état fondamental, des constantes de couplage spin-orbite atomique et de termes qui décrivent les états excités de la molécule. Pour des radicaux  $\pi$  possédant des états excités non-liants de basse énergie, ces termes

vont accentuer de façon significative la contribution du couplage spin-orbite (voir chapitre I). C'est ce qui est attendu dans le cas des radicaux phéophytines. De plus, dans le cas de ces radicaux, la densité de spin est localisée principalement sur les atomes d'azote non-protonés et l'atome d'oxygène du groupement carbonyle du cycle V<sup>37,38</sup>. Ces atomes ont des constantes de couplage spin-orbite plus large que des atomes de carbone. L'ensemble de ces résultats expliquent l'anisotropie Zeeman observée

expérimentalement pour les radicaux anions phéophytine et bactériophéophytine. Il y a deux explications possibles pour expliquer la faible différence mesurée pour l'anisotropie Zeeman des phéophytine de plante et de bactérie. La plus évidente est que les différences structurales intrinsèques entre les deux types de phéophytine induisent suffisamment de différences dans la structure électronique pour être reflétées dans l'anisotropie Zeeman. La deuxième explication est basée sur



**Figure 12.** Spectres RPE haut champ obtenus pour le radical anion phéophytine dans des échantillons orientés de PS II. Trait plein : spectre expérimental. Conditions expérimentales :  $\nu_{mw}=285.090$  GHz, amplitude de modulation 1.4 mT, température 4.2 K. Trait pointillé : spectre calculé. Paramètres des simulations :  $g_x=2.00451$ ,  $g_y=2.00320$ ,  $g_z=2.00237$ ,  $\beta=70^\circ$  (distribution  $20^\circ$ ),  $\gamma=2^\circ$  (distribution  $20^\circ$ ).

l'observation qu'une partie appréciable de la densité de spin réside sur l'atome d'oxygène du groupement carbonyle du cycle V<sup>37,38</sup> et l'énergie des orbitales non-liantes de ce carbonyle va être sensible à l'environnement protéique local. Ainsi, il est possible que les différences observées reflètent davantage l'environnement électrostatique local du radical dans la protéine que des différences de structure propre au radical.

Les spectres obtenus pour les échantillons orientés sont représentés sur la figure 12. Les simulations sont représentées avec les spectres expérimentaux. La largeur spectrale totale observée expérimentalement pour les échantillons orientés est sensiblement plus grande que pour le spectre



correctement les spectres expérimentaux. La largeur à mi-hauteur de la distribution gaussienne utilisée est de  $20^\circ$ , identique à celle utilisée pour les deux autres radicaux étudiés.

Contrairement aux radicaux tyrosyles et quinoniques, l'orientation des directions principales du tenseur  $\mathbf{g}$  par rapport à la molécule n'est pas connue dans le cas des phéophytines. Il est donc intéressant de comparer les résultats obtenus pour le PS II et les structures disponibles pour les bactéries pourpres. Dans le cas de *R. sphaeroides* et de *R. viridis*, l'angle entre le plan du radical et celui de la membrane est respectivement de  $67^\circ$  et  $65^\circ$ . Ceci est comparable à la valeur de  $70^\circ$  mesurée dans le cas du PS II<sup>39</sup>. L'angle d'Euler  $\gamma$  donne la position des axes  $g_x$  et  $g_y$  dans le plan du radical. En supposant que la phéophytine dans le PS II est positionnée de la même façon que la bactériophéophytine dans les bactéries pourpres, la comparaison directe des structures cristallographiques disponibles pour les bactéries avec les valeurs des angles d'Euler mesurée pour le PS II permet d'attribuer les directions  $g_x$  et  $g_y$  dans le plan du radical. Les axes principaux du tenseur  $\mathbf{g}$  sont représentés sur le schéma 7. L'axe  $g_x$  passe par les deux azotes protonés des cycles I et III. Il est intéressant de noter que cette direction coïncide avec la direction de la liaison carbonyle du cycle V. Ceci est en accord avec une contribution relativement large du couplage spin-orbite de l'atome d'oxygène du carbonyle à l'anisotropie du facteur  $g$  comme discuté plus haut. L'axe  $g_y$  est perpendiculaire à l'axe  $g_x$  dans le plan de la molécule et passe par les deux azotes non-protonés des cycles II et IV. Le cycle II est non-saturé dans la phéophytine-*a* alors qu'il est saturé dans le cas de la bactériophéophytine-*b*. Ceci peut induire des changements géométriques au niveau de l'atome d'azote du cycle ce qui expliquerait en partie la plus grande différence observée pour la valeur  $g_y$  par rapport à  $g_x$  entre la phéophytine et la bactériophéophytine. Bien que l'attribution des axes moléculaires repose sur une hypothèse qui ne peut pas être vérifiée pour l'instant, elle est cependant en accord avec l'ensemble des observations faites concernant les valeurs de  $g$  du radical.

## VIII. CONCLUSION

Les données présentées fournissent des informations structurales sur certains cofacteurs du Photosystème II. Les résultats obtenus sur la quinone et la phéophytine confirment la similitude structurale entre le centre réactionnel des bactéries pourpres et le photosystème II en ce qui concerne le côté accepteur. La proposition d'orientation du tenseur  $\mathbf{g}$  par rapport à la molécule de phéophytine a conduit à la mise en œuvre d'expériences qui sont présentées au chapitre VI.



## RÉFÉRENCES

- [1] RHEE, K. H., MORRIS, E. P., BARBER, J. & KUHLEBRANDT, W. (1998) Three-dimensional structure of the plant photosystem II reaction centre at 8 Å resolution. *Nature* **396**, 283-6.
- [2] RUTHERFORD, A. W. (1989) Photosystem II, the water-splitting enzyme. *Trends Biochem Sci* **14**, 227-32.
- [3] MICHEL, H. & DEISENHOFER, J. (1988) Relevance of the photosynthetic reaction center from purple bacteria to the structure of photosystem II. *Biochemistry* **27**, 1-7.
- [4] DEBUS, R. J., BARRY, B. A., BABCOCK, G. T. & MCINTOSH, L. (1988) Site-directed mutagenesis identifies a tyrosine radical involved in the photosynthetic oxygen-evolving system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 427-30.
- [5] VERMAAS, W. F. J., RUTHERFORD, A. W. & HANSSON, Ö. (1988) Site-directed mutagenesis in photosystem II of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803: donor D is a tyrosine residue in the D2 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 8477-8481.
- [6] TANG, X. S. & SATOH, K. (1985) The oxygen-evolving photosystem II core complex. *FEBS Lett* **179**, 60-64.
- [7] YAMADA, Y., TANG, X. S., ITOH, S. & SATOH, K. (1987) Purification and properties of an oxygen-evolving photosystem II reaction-center complex from spinach. *Biochim Biophys Acta* **891**, 129-137.
- [8] SVENSSON, B., VASS, I., CEDERGREN, E. & STYRING, S. (1990) Structure of donor side components in photosystem II predicted by computer modelling. *Embo J* **9**, 2051-9.
- [9] RUFFLE, S. V., DONNELLY, D., BLUNDELL, T. L. & NUGENT, J. H. (1992) A three-dimensional model of the photosystem II reaction center of *Pisum sativum*. *Photosynth Res* **34**, 287-300.
- [10] KOULOGLIOTIS, D., TANG, X. S., DINER, B. A. & BRUDVIG, G. W. (1995) Spectroscopic evidence for the symmetric location of tyrosines D and Z in photosystem II. *Biochemistry* **34**, 2850-6.
- [11] ZECH, S. G., KURRECK, J., ECKERT, H. J., RENGEL, G., LUBITZ, W. & BITTL, R. (1997) Pulsed EPR measurement of the distance between  $P_{680}^{+}$  and  $Q_A^{\bullet-}$  in photosystem II. *FEBS Lett* **414**, 454-6.
- [12] HARA, H., DZUBA, S. A., KAWAMORI, A., AKABORI, K., TOMO, T., SATOH, K., IWAKI, M. & ITOH, S. (1997) The distance between  $P_{680}$  and  $Q_A$  in Photosystem II determined by ESEEM spectroscopy. *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics* **1322**, 77-85.
- [13] YOSHII, T., KAWAMORI, A., TONAKA, M. & AKABORI, K. (1999) Relative positions of electron transfer components in Photosystem II studied by '2+1' pulsed electron

- paramagnetic resonance:  $Y_D$  and  $Q_A$ . *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics* **1413**, 43-49.
- [14] UN, S., BRUNEL, L. C., BRILL, T. M., ZIMMERMANN, J. L. & RUTHERFORD, A. W. (1994) Angular orientation of the stable tyrosyl radical within photosystem II by high-field 245-GHz electron paramagnetic resonance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 5262-6.
- [15] LAKSHMI, K. V., EATON, S. S., EATON, G. R. & BRUDVIG, G. W. (1999) Orientation of the tetranuclear manganese cluster and tyrosine Z in the  $O_2$ -evolving complex of photosystem II: An EPR study of the  $S_2Y_Z^\bullet$  state in oriented acetate-inhibited photosystem II membranes. *Biochemistry* **38**, 12758-12767.
- [16] RUTHERFORD, A. W. (1985) Orientation of EPR signals arising from components in photosystem II membranes. *Biochim Biophys Acta* **807**, 189-201.
- [17] KURSHEV, V. V., RAITSIMRING, A. M. & TSVETKOV, Y. D. (1989) Selection of dipolar interaction by the "2+1" pulse train ESE. *J Magn Reson* **81**, 441-454.
- [18] ROSE, M. E. (1967) in *Elementary Theory of Angular Momentum*. Wiley, New York.
- [19] BLUM, H., SALERNO, J. C. & LEIGH, J. S. J. (1978) A model for the simulation of the EPR spectra of chromophores in partially oriented membrane multilayers. *J Magn Reson* **30**, 385-391.
- [20] HOGANSON, C. W. & BABCOCK, G. T. (1992) Protein-tyrosyl radical interactions in photosystem II studied by electron spin resonance and electron nuclear double resonance spectroscopy: comparison with ribonucleotide reductase and in vitro tyrosine. *Biochemistry* **31**, 11874-80.
- [21] RIGBY, S. E., NUGENT, J. H. & O'MALLEY, P. J. (1994) The dark stable tyrosine radical of photosystem 2 studied in three species using ENDOR and EPR spectroscopies. *Biochemistry* **33**, 1734-42.
- [22] WARNCKE, K., BABCOCK, G. T. & MCCracken, J. (1994) Structure of the  $Y_D$  tyrosine radical in photosystem II as revealed by  $^2H$  electron spin echo envelope modulation (ESEEM) spectroscopic analysis of hydrogen hyperfine interactions. *J Am Chem Soc* **116**, 7332-7340.
- [23] DELIGIANNAKIS, Y., JEGERSCHOLD, C. & RUTHERFORD, A. W. (1997) EPR and ESEEM study of the plastoquinone anion radical  $Q_A^{\bullet-}$  in photosystem II treated at high pH. *Chemical Physics Letters* **270**, 564-572.
- [24] SANAKIS, Y., PETROULEAS, V. & DINER, B. A. (1994) Cyanide binding at the non-heme  $Fe^{2+}$  of the iron-quinone complex of photosystem II: at high concentrations, cyanide converts the  $Fe^{2+}$  from high ( $S = 2$ ) to low ( $S = 0$ ) spin. *Biochemistry* **33**, 9922-8.
- [25] BURGHHAUS, O., PLATO, M., ROHRER, M., MÖBIUS, K., MACMILLAN, F. & LUBITZ, W. (1993) 3-mm high-field EPR on semiquinone radical anions  $Q^{\bullet-}$  related to photosynthesis and on the primary donor  $P^{\bullet+}$  and acceptor  $Q_A^{\bullet-}$  in reaction centers of *Rhodobacter sphaeroides* R-26. *Journal of Physical Chemistry* **97**, 7639-7647.

- [26] KNÜPLING, M., TÖRRING, J. T. & UN, S. (1997) The relationship between the molecular structure of semiquinone radicals and their g-values. *Chemical Physics* **219**, 291-304.
- [27] DELIGIANNAKIS, Y., HANLEY, J. & RUTHERFORD, A. W. (1999) 1D- and 2D-ESEEM Study of the Semiquinone Radical  $Q_A^-$  of Photosystem II. *J Am Chem Soc* **121**, 7653.
- [28] DEISENHOFER, J., EPP, O., SINNING, I. & MICHEL, H. (1994) PDB code 1PRC (revised 1PRCC).
- [29] YEATES, T. O., KOMIYA, H., CHIRINO, A., REES, D. C., ALLEN, J. P. & FEHER, G. (1993) PDB code 4RCR.
- [30] MACMILLAN, F., HANLEY, J., VAN DER WEERD, L., KNUPLING, M., UN, S. & RUTHERFORD, A. W. (1997) Orientation of the phyloquinone electron acceptor anion radical in photosystem I. *Biochemistry* **36**, 9297-9303.
- [31] KAMLOWSKI, A., ALTENBERG-GREULICH, B., VAN DER EST, A., ZECH, S. G., BITTL, R., FROMME, P., LUBITZ, W. & STEHLIK, D. (1998) The quinone acceptor  $A_1$  in photosystem I: Binding site, and comparison to  $Q_A$  in purple bacteria reaction centers. *Journal of Physical Chemistry B* **102**, 8278-8287.
- [32] ASTASHKIN, A. V., HARA, H., KUROIWA, S., KAWAMORI, A. & AKABORI, K. (1998) A comparative electron spin echo envelope modulation study of the primary electron acceptor quinone in Zn-substituted and cyanide-treated preparations of photosystem II. *Journal of Chemical Physics* **108**, 10143-10151.
- [33] VAN MIEGHEM, F. J. E., NITSCHKE, W., MATHIS, P. & RUTHERFORD, A. W. (1989) The influence of the quinone-iron electron acceptor complex on the reaction centre photochemistry of photosystem II. *Biochim Biophys Acta* **977**, 207-214.
- [34] STONE, A. J. (1963) Gauge invariance of the g tensor. *Proc R Soc London, Ser A* **271**, 424-34.
- [35] STONE, A. J. (1963) g factors of aromatic free radicals. *Mol Phys* **6**, 509-15.
- [36] STONE, A. J. (1964) g tensors of aromatic hydrocarbons. *Mol Phys* **7**, 311-16.
- [37] O'MALLEY, P. J. (1999) The electronic structure of the bacteriopheophytin anion radical, in vivo. *Journal of the American Chemical Society* **121**, 3185-3192.
- [38] O'MALLEY, P. J. (2000) Hybrid density functional studies of pheophytin anion radicals: Implications for initial electron transfer in photosynthetic reaction centers. *Journal of Physical Chemistry B* **104**, 2176-2182.
- [39] GANAGO, I. B., KLIMOV, V. V., GANAGO, A. O., SHUVALOV, V. A. & EROKHIN, Y. E. (1982) Linear dichroism and orientation of pheophytin, the intermediary electron acceptor in photosystem II reaction centers. *FEBS Lett* **140**, 127-130.

# CHAPITRE III



## ETUDE DE L'INTERACTION $Y_Z^\bullet$ - CLUSTER A MANGANESE DANS LE PHOTOSYSTEME II

---

## CHAPITRE III :

### ETUDE DE L'INTERACTION $Y_Z^\bullet$ -CLUSTER A MANGANESE DANS LE PHOTOSYSTEME II

---

#### I. INTRODUCTION : INTERACTION DE LA TYROSINE Z ET DU CLUSTER A MANGANESE DANS LE PHOTOSYSTEME II

Dans l'état  $S_2$  du cycle catalytique du photosystème II, le cluster à manganèse possède un spin effectif demi-entier à l'origine du signal RPE observé appelé 'multiligne' en raison de la structure hyperfine due aux noyaux  $^{55}\text{Mn}$  (voir chapitre I)<sup>1</sup>. Deux cofacteurs inorganiques, les ions calcium et chlorure, sont requis pour que le système fonctionne correctement. Dans les préparations où l'un de ces cofacteurs a été enlevé, l'oxydation de l'eau est inhibée<sup>2-5</sup>. Dans plusieurs de ces préparations, la transition entre les états  $S_2$  et  $S_3$  est bloquée et un éclaircissement à 273 K permet d'accumuler un état particulier. Cet état est caractérisé par un signal RPE large qui provient de l'interaction entre un radical organique et le cluster à manganèse dans un état formel  $S_2^6$ . Cet état, parfois appelé état  $S_3$  modifié ou état  $S_2\text{-Rad}^\bullet$ , a été découvert pour la première fois dans des préparations où les ions calcium avaient été enlevés<sup>6</sup>.

L'addition de fortes concentrations d'acétate à un échantillon inhibe également le système et permet de piéger un signal RPE large attribué au même état<sup>7</sup>. L'anion acétate est supposé inhiber le dégagement d'oxygène en remplaçant le cofacteur chlorure<sup>8-11</sup>. La largeur du signal RPE, qui représente la force de l'interaction magnétique, varie de 9 à 23 mT environ suivant le type de traitement effectué<sup>6,7,12-14</sup>. La nature du radical impliqué dans l'interaction a été l'objet de longs débats. Il y avait cependant accord sur le fait qu'il s'agissait d'un résidu aminoacide, soit histidine soit tyrosine<sup>2,15-18</sup>. En utilisant l'ESEEM en conjonction avec des échantillons de PS II traités à l'acétate et spécifiquement deutérés sur les résidus tyrosines dans des mutants de cyanobactéries, le radical a pu être identifié à  $Y_Z^\bullet$ <sup>19</sup>. L'état dans lequel ce radical interagit avec le cluster à manganèse

est appelé  $S_2Y_Z^\bullet$ . Dans le système natif, il n'est pas possible de piéger  $Y_Z^\bullet$  à cause de la réduction rapide du radical par le cluster métallique.

Plusieurs études RPE et des simulations ont été faites sur le signal de l'état  $S_2Y_Z^\bullet$ , en partie pour déterminer la nature du couplage. Dans les préparations dépourvues de calcium, Boussac et collaborateurs ont simulé le signal RPE en supposant un faible couplage d'échange entre le radical et le cluster métallique<sup>6</sup>. De la même manière, MacLachlan et collaborateurs ont simulé ce signal en étendant l'étude aux préparations traitées à l'acétate de sodium, l'acétate de calcium et le chlorure d'ammonium<sup>20</sup>. Les caractéristiques spectrales pour les différents types de préparations ont pu être reproduites en utilisant un faible couplage d'échange entre les deux espèces paramagnétiques. Britt et ses collaborateurs ont simulé les données RPE en modélisant l'interaction par un couplage dipolaire<sup>18,21</sup> (et en supposant un état de spin  $S=1$  pour le cluster dans la référence<sup>18</sup>). Sur la base de données ENDOR de  $^{55}\text{Mn}$ , ils ont effectué de nouvelles simulations avec un couplage d'échange prédominant entre deux spins  $1/2$ <sup>22</sup>. D'autres simulations récentes<sup>23,24</sup>, basées sur un modèle incluant à la fois une interaction d'échange et une interaction dipolaire entre les deux spins dans le cas des préparations de PS II traitées à l'acétate, ont montré que la contribution d'échange est prédominante avec un couplage de 800 à 850 MHz en valeur absolue et une contribution dipolaire de -140 à -170 MHz.

Dans ce travail, l'interaction entre les deux espèces a été caractérisée en utilisant la RPE à champ intense à différentes fréquences dans la gamme 95-285 GHz pour les préparations de PS II dépourvues de calcium ou traitées à l'acétate. Les données expérimentales ont été simulées et analysées avec celles obtenues à 9 GHz. Nous avons pu montrer en particulier que l'utilisation des hautes fréquences permet de déterminer le signe de l'interaction d'échange (couplage ferromagnétique ou antiferromagnétique dans le cas d'un couplage d'échange).

## II. THEORIE DES SPECTRES RPE POUR DEUX SPINS $S = 1/2$ COUPLES

L'analyse théorique de deux spins  $1/2$  couplés a déjà été développée en détails dans la littérature<sup>25-27</sup>. Dans cette partie, nous rappelons les équations principales utilisées en mettant l'accent sur les aspects qui sont particulièrement importants pour l'étude de tels systèmes par la RPE à champ intense. L'Hamiltonien de spin décrivant le système est donné par :

$$\hat{H} = \beta \mathbf{H}_0 \cdot \tilde{\mathbf{g}}_{\text{Tyr}} \cdot \hat{\mathbf{S}}_{\text{Tyr}} + \beta \mathbf{H}_0 \cdot \tilde{\mathbf{g}}_{\text{Mn}} \cdot \hat{\mathbf{S}}_{\text{Mn}} + \sum_{i=1}^4 \hat{\mathbf{I}}_i \cdot \tilde{\mathbf{A}}_i \cdot \hat{\mathbf{S}}_{\text{Mn}} + \hat{\mathbf{S}}_{\text{Tyr}} \cdot \tilde{\mathbf{C}} \cdot \hat{\mathbf{S}}_{\text{Mn}} \quad (\text{Eq. 3.1})$$

où les paramètres  $\mathbf{g}_{\text{Tyr}}$ ,  $\mathbf{g}_{\text{Mn}}$ ,  $\mathbf{A}_i$  et  $\mathbf{C}$  sont des tenseurs,  $\mathbf{H}_0$  est le champ magnétique appliqué et  $\mathbf{S}$  et  $\mathbf{I}$  sont les opérateurs de spins électronique et nucléaire respectivement. Le cluster à manganèse est en fait décrit par des paramètres de spin effectif et des opérateurs qui décrivent son état fondamental  $S_{\text{Mn}} = 1/2$ . Le terme hyperfin pour le radical tyrosyle est négligé car les valeurs des couplages hyperfins<sup>28</sup> sont très inférieures à la largeur de raie des signaux étudiés. Dans l'Hamiltonien, les termes Zeeman sont largement dominants devant les termes hyperfins et de couplages. Une conséquence importante est que le nombre de paramètres introduit par les tenseurs hyperfins et de couplage est grandement réduit. De plus, si on fait l'approximation que les axes des tenseurs sont colinéaires, l'équation 3.1 se simplifie largement pour donner l'expression suivante :

$$\begin{aligned} \hat{H} = & g_{\text{Tyr}} \beta H_0 \hat{S}_{\text{Tyr}Z} + (g_{\text{Mn}} \beta H_0 + \sum_{i=1}^4 A_i \hat{I}_{iZ}) \hat{S}_{\text{Mn}Z} \\ & + C_{ZZ} \hat{S}_{\text{Tyr}Z} \hat{S}_{\text{Mn}Z} + C_{\pm} (\hat{S}_{\text{Tyr}+} \hat{S}_{\text{Mn}-} + \hat{S}_{\text{Tyr}-} \hat{S}_{\text{Mn}+}) \end{aligned} \quad (\text{Eq. 3.2})$$

avec :

$$g = \sqrt{g_X^2 \sin^2 \theta \cos^2 \varphi + g_Y^2 \sin^2 \theta \sin^2 \varphi + g_Z^2 \cos^2 \theta} \quad (\text{Eq. 3.3})$$

et :

$$A_i = \frac{1}{g_{\text{Mn}}^2} \left( \sqrt{a_{iX}^2 g_{\text{Mn}X}^2 \sin^2 \theta \cos^2 \varphi + a_{iY}^2 g_{\text{Mn}Y}^2 \sin^2 \theta \sin^2 \varphi + a_{iZ}^2 g_{\text{Mn}Z}^2 \cos^2 \theta} \right) \quad (\text{Eq. 3.4})$$

$S_+$  et  $S_-$  sont les opérateurs échelles et  $C_{\pm}$  et  $C_{ZZ}$  les éléments du tenseur  $\mathbf{C}$ .

Dans ces expressions tous les paramètres sont des scalaires. Les angles  $\theta$  et  $\varphi$  sont les coordonnées sphériques définissant l'orientation du champ magnétique appliqué dans le repère principal lié au tenseur  $\mathbf{g}$ .

L'interaction entre les deux spins peut être séparée en une interaction d'échange isotrope et une interaction dipolaire anisotrope. L'Hamiltonien d'échange d'Heisenberg est donné par :

$$\hat{H}_{\text{ECH}} = -J \hat{\mathbf{S}}_{\text{Tyr}} \cdot \hat{\mathbf{S}}_{\text{Mn}} = -J (\hat{S}_{\text{Tyr}X} \hat{S}_{\text{Mn}X} + \hat{S}_{\text{Tyr}Y} \hat{S}_{\text{Mn}Y} + \hat{S}_{\text{Tyr}Z} \hat{S}_{\text{Mn}Z}) = -J \left[ \frac{\hat{S}_{\text{Tyr}+} \hat{S}_{\text{Mn}-} + \hat{S}_{\text{Tyr}-} \hat{S}_{\text{Mn}+}}{2} + \hat{S}_{\text{Tyr}Z} \hat{S}_{\text{Mn}Z} \right] \quad (\text{Eq. 3.5})$$

Dans le cadre de l'approximation point-dipôle, l'Hamiltonien pour l'interaction dipolaire s'écrit :

$$\begin{aligned}\hat{H}_{DIP} &= \frac{1}{2}D(\cos^2\Theta - \frac{1}{3})(3\hat{S}_Z^2 - \hat{S}^2) \\ &= 2D(\cos^2\Theta - \frac{1}{3})\left[\hat{S}_{TyrZ}\hat{S}_{MnZ} - \frac{(\hat{S}_{Tyr+}\hat{S}_{Mn-} + \hat{S}_{Tyr-}\hat{S}_{Mn+})}{4}\right] = d\left[\hat{S}_{TyrZ}\hat{S}_{MnZ} - \frac{(\hat{S}_{Tyr+}\hat{S}_{Mn-} + \hat{S}_{Tyr-}\hat{S}_{Mn+})}{4}\right]\end{aligned}\quad (Eq. 3.6)$$

$$\text{où :} \quad D = -\frac{3\mu^0}{8\pi}g_1g_2\beta^2\frac{1}{r^3} \quad (Eq. 3.7)$$

et  $\Theta$  est l'angle entre le champ magnétique appliqué et le vecteur joignant les deux dipôles.

L'Hamiltonien d'interaction pour le système couplé s'écrit donc :

$$\hat{H} = \hat{H}_{ECH} + \hat{H}_{DIP} = (-J + d)\hat{S}_{TyrZ}\hat{S}_{MnZ} - \frac{2J+d}{4}(\hat{S}_{Tyr+}\hat{S}_{Mn-} + \hat{S}_{Tyr-}\hat{S}_{Mn+}) \quad (Eq. 3.8)$$

et, par identification des équations 3.2. et 3.8., il en résulte que  $C_{ZZ} = -J+d$  et  $C_{\pm} = -(2J+d)/4$ .

L'Hamiltonien de l'équation 3.8. peut-être résolu analytiquement. Pour ce faire, les vecteurs propres du système en absence d'interaction ( $|\alpha\alpha m_I\rangle$ ;  $|\alpha\beta m_I\rangle$ ;  $|\beta\alpha m_I\rangle$ ;  $|\beta\beta m_I\rangle$ ) sont utilisés comme vecteurs de base pour la diagonalisation. Dans cette base, l'Hamiltonien est diagonal par blocs. Les niveaux  $|\beta\beta m_I\rangle$  et  $|\alpha\alpha m_I\rangle$  ne sont pas affectés et constituent respectivement les niveaux le plus bas et le plus haut en énergie. Le dernier bloc est une matrice de dimension 2 dont la diagonalisation conduit à deux niveaux intermédiaires en énergie. Ces résultats décrivent un système à quatre niveaux, chacun des niveaux étant subdivisé en 1296 sous-niveaux hyperfins. Les vecteurs propres et énergies du système couplés sont :

$$|1\rangle = |\alpha\alpha m_I\rangle \quad E_1 = [(g_1 + g_2)\beta H_0 + \sum m_I A + (-J+d)/2]/2 \quad (Eq. 3.9)$$

$$|2\rangle = \cos\theta |\alpha\beta m_I\rangle + \sin\theta |\beta\alpha m_I\rangle \quad E_2 = (J-d)/4 + \Omega \quad (Eq. 3.10)$$

$$|3\rangle = -\sin\theta |\alpha\beta m_I\rangle + \cos\theta |\beta\alpha m_I\rangle \quad E_3 = (J-d)/4 - \Omega \quad (Eq. 3.11)$$

$$|4\rangle = |\beta\beta m_I\rangle \quad E_4 = [-(g_1 + g_2)\beta H_0 - \sum m_I A + (-J+d)/2]/2 \quad (Eq. 3.12)$$

$$\text{avec:} \quad \Omega^2 = \left[\frac{1}{2}(g_{Tyr} - g_{Mn})\beta H_0 - \frac{1}{2}\sum_i m_i A_i\right]^2 + \left[\frac{2J+d}{4}\right]^2$$



Les transitions permises sont donc :

$$\Delta E_{34}=[g_{Tyr}\beta H_0+(g_{Mn}\beta H_0+\sum m_i A_i)-\Omega+(J-d)]/2 \quad (\text{Eq. 3.13})$$

$$\Delta E_{24}=[g_{Tyr}\beta H_0+(g_{Mn}\beta H_0+\sum m_i A_i)+\Omega+(J-d)]/2 \quad (\text{Eq. 3.14})$$

$$\Delta E_{13}=[g_{Tyr}\beta H_0+(g_{Mn}\beta H_0+\sum m_i A_i)+\Omega-(J-d)]/2 \quad (\text{Eq. 3.15})$$

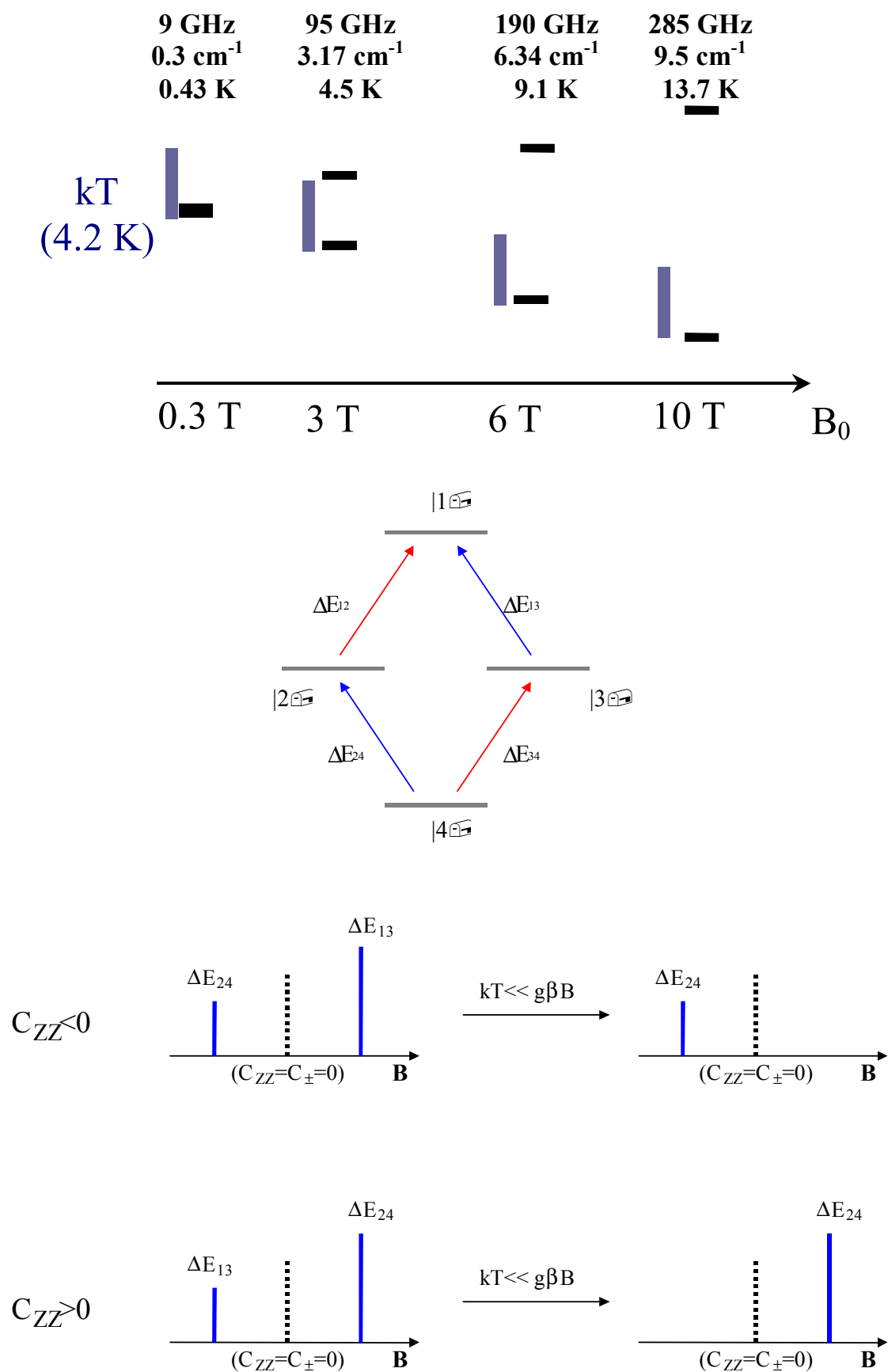
$$\Delta E_{12}=[g_{Tyr}\beta H_0+(g_{Mn}\beta H_0+\sum m_i A_i)-\Omega-(J-d)]/2 \quad (\text{Eq. 3.16})$$

Un aspect du système à quatre niveaux particulièrement important pour la RPE à champ intense est la population thermique des quatre niveaux de spin. Pour un champ appliqué d'environ 10 T, l'énergie des transitions autorisées à partir de l'état de spin fondamental est de l'ordre de 285 GHz ce qui correspond à une température ( $h\nu/k$ ) de 14 K. Ainsi, pour les spectres enregistrés à 4 K, seul le niveau fondamental va être peuplé de façon significative et seulement deux transitions sur les quatre autorisées vont être observées (voir schéma 1). Les énergies de ces transitions sont données par les équations 3.13 et 3.14 La position de ces transitions par rapport aux résonances observées en absence d'interaction est déterminée par le signe de  $J-d$ , ainsi l'enregistrement des spectres à champ intense à basse température permet de déterminer directement le signe du couplage et de préciser, dans le cas d'une contribution d'échange dominante, s'il s'agit d'un couplage ferromagnétique ou antiferromagnétique.

Dans le modèle choisi pour effectuer les simulations, la partie isotrope de l'interaction est attribuée à une interaction d'échange d'Heisenberg. La partie anisotrope est modélisée par l'interaction dipolaire en utilisant l'approximation point-dipôle. Il est important de préciser que le radical est en réalité couplé aux quatre ions du cluster à manganèse. Ceci a d'importantes conséquences qui ont été étudiées par Bertrand et collaborateurs dans des systèmes semblables<sup>29</sup>. La somme des constantes de couplage avec chaque ion métallique peut être réduite à une constante unique de couplage effectif de la façon suivante :

$$\hat{H}_{EX} = -\sum_{i=1}^4 J_i \hat{S}_{Mn_i} \cdot \hat{S}_{Tyr} = -(\sum_{i=1}^4 K_i J_i) \hat{S}_{Mn} \cdot \hat{S}_{Tyr} = -J \hat{S}_{Mn} \cdot \hat{S}_{Tyr} \quad (\text{Eq. 3.17})$$

où les coefficients  $K_i$  sont calculés en utilisant le théorème de Wigner-Eckart. Même si la nature du couplage effectif est connue, il n'est pas possible de faire une interprétation physique au niveau moléculaire à moins que les coefficients  $K_i$  ne soient connus. D'autre part, même si les interactions intrinsèques  $J_i$  sont antiferromagnétiques, le couplage effectif peut être ferromagnétique suivant les valeurs des coefficients  $K_i$ . Il est à noter que le même raisonnement s'applique pour l'interaction

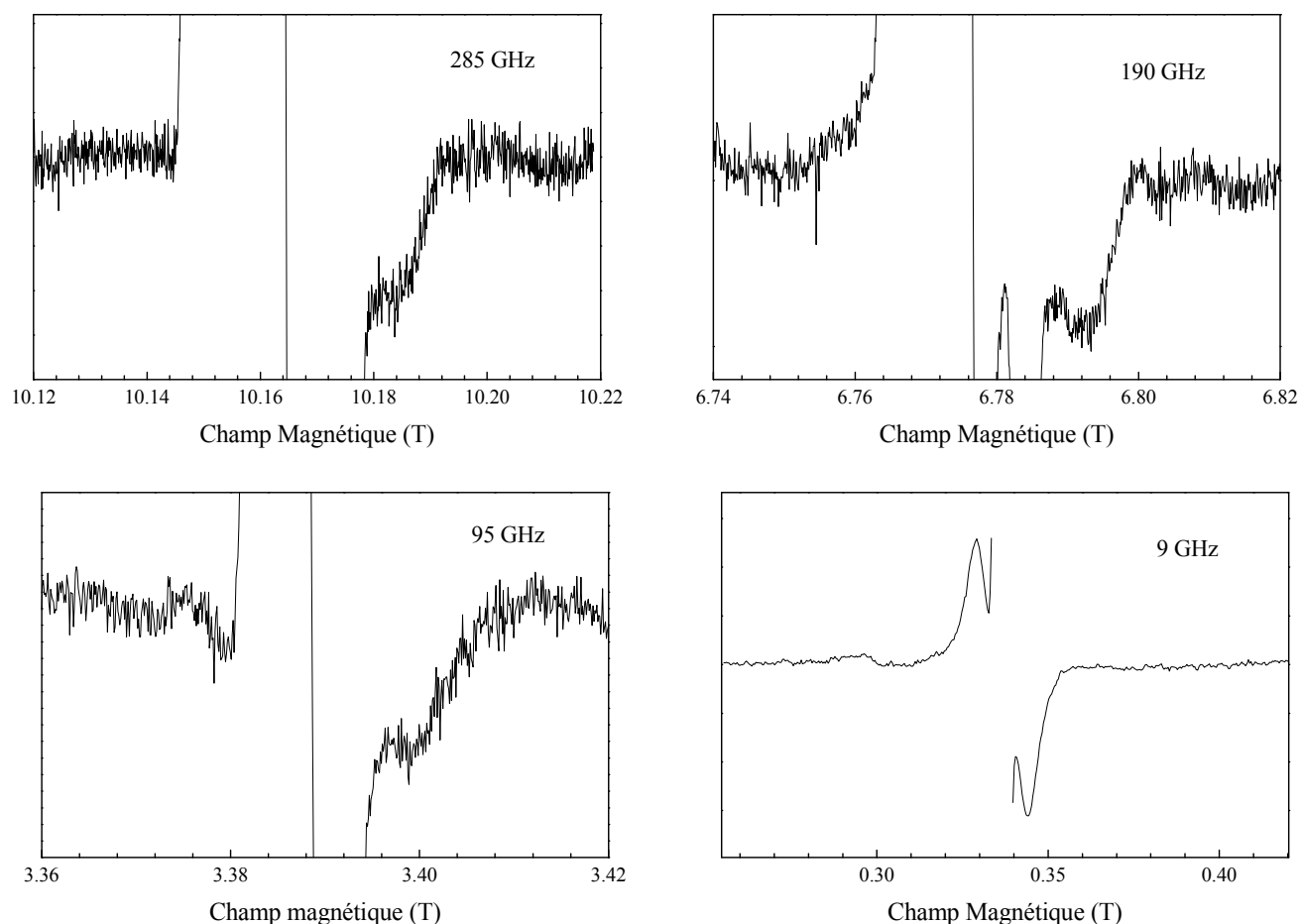


**Schéma 1.** Schéma des niveaux d'énergie et des transitions correspondantes pour le système étudié. L'effet de la température sur les spectres est indiqué ; le schéma du haut compare l'énergie Boltzmann disponible à 4.2 K avec l'énergie Zeeman due à l'application d'un champ magnétique.

dipolaire. Ainsi, le paramètre  $D$  qui est toujours négatif pour une interaction point-dipôle pure peut être positif lorsqu'il s'agit d'un paramètre effectif<sup>29,30</sup>.

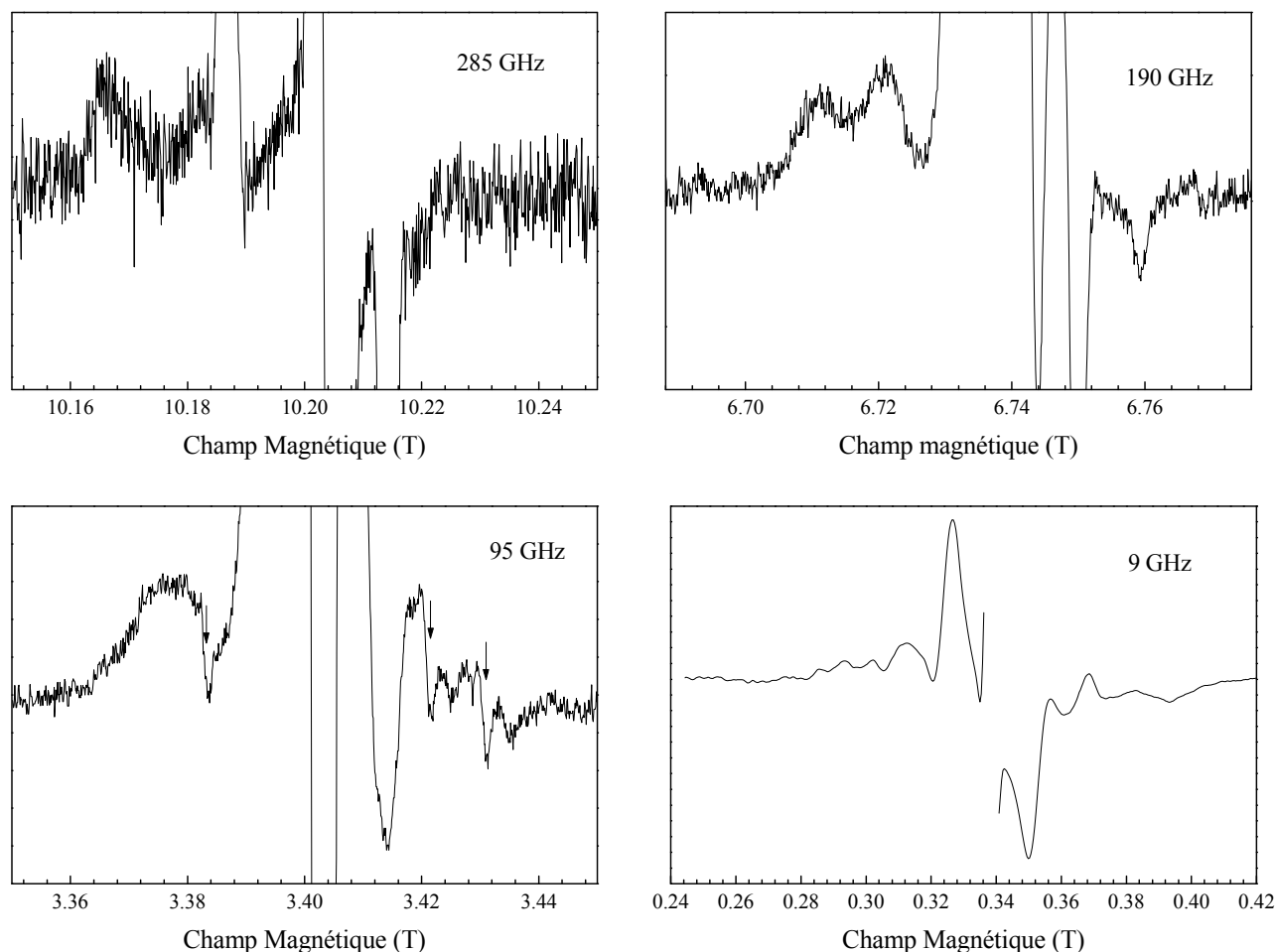
### III. POSITION ET FORME DU SIGNAL $S_2Y_Z^{\bullet}$

Les figures 1 et 2 montrent les spectres RPE obtenus pour des préparations de PS II dépourvues de calcium ou traitées à l'acétate respectivement dans lesquelles l'état  $S_2Y_Z^{\bullet}$  a été piégé. Dans tous les cas, le radical stable de la tyrosine  $D$  donne un signal intense qui se superpose en partie avec le signal étudié. Dans les préparations sans  $Ca^{2+}$ , le spectre à 9 GHz montre un signal dédoublé espacé



**Figure 1.** Spectres RPE de l'état  $S_2Y_Z^{\bullet}$  dans les membranes de PS II dépourvues de calcium. Conditions expérimentales : (285 GHz)  $\nu_{mw} = 285.1383$  GHz, amplitude de modulation 2 mT, fréquence de modulation 3332 Hz, température  $T = 4.2$  K, constante de temps 300 ms ; (190 GHz)  $\nu_{mw} = 190.1634$  GHz, amplitude de modulation 1.5 mT, fréquence de modulation 3332 Hz, température  $T = 4.2$  K, constante de temps 1 s ; (95 GHz)  $\nu_{mw} = 95.0315$  GHz, amplitude de modulation 2 mT, fréquence de modulation 3332 Hz, température  $T = 4.2$  K, constante de temps 300 ms ; (9 GHz)  $\nu_{mw} = 9.43305$  GHz, amplitude de modulation 1.5 mT, fréquence de modulation 100 kHz, température  $T = 10$  K, constante de temps 20 ms.

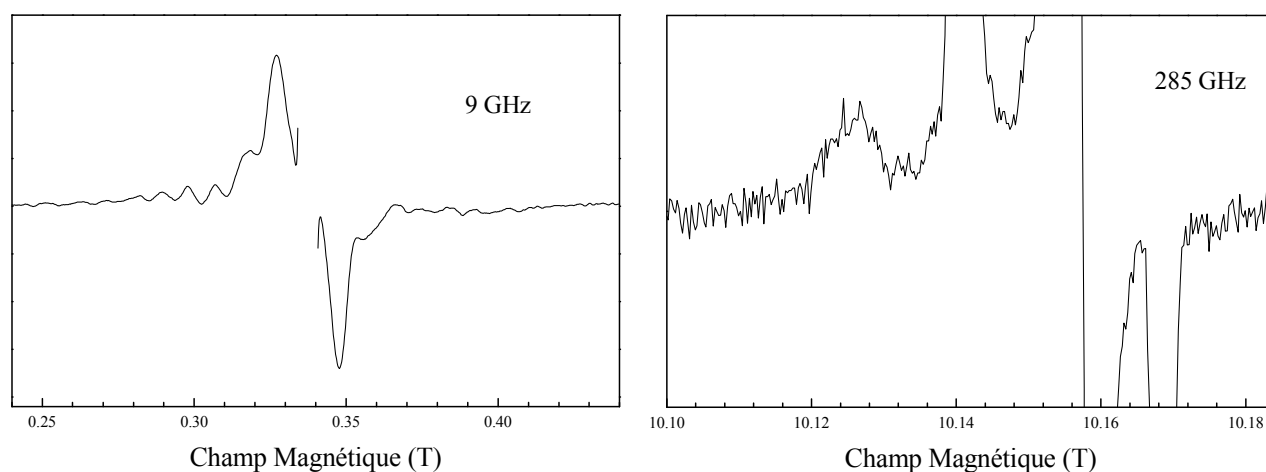
de 14.5 mT pic à pic. Dans les échantillons traités à l'acétate le spectre est constitué par un signal dédoublé principal de 23 mT de largeur pic à pic accompagné d'un second signal dédoublé de 44 mT de largeur et d'un signal multiligne sous-jacent. Ces signaux correspondent aux spectres usuels



**Figure 2.** Spectres RPE de l'état  $S_2YZ^*$  dans les membranes de PS II traitées à l'acétate. Conditions expérimentales : (285 GHz)  $\nu_{mw} = 286.2321$  GHz, amplitude de modulation 2 mT, fréquence de modulation 3318 Hz, température  $T = 2.5$  K, constante de temps 300 ms ; (190 GHz)  $\nu_{mw} = 189.1418$  GHz, amplitude de modulation 2 mT, fréquence de modulation 3318 Hz, température  $T = 3.0$  K, constante de temps 1 s ; (95 GHz)  $\nu_{mw} = 95.3559$  GHz, amplitude de modulation 1.5 mT, fréquence de modulation 3332 Hz, température  $T = 3.0$  K, constante de temps 1 s, les flèches indiquent la position de trois des six raies hyperfines du signal de  $Mn^{2+}$  contaminant ; (9 GHz)  $\nu_{mw} = 9.4677$  GHz, amplitude de modulation 1.27 mT, fréquence de modulation 100 kHz, température  $T = 10$  K, constante de temps 41 ms.

observés pour ce type de préparations. Les autres spectres de ces figures ont été obtenus par RPE à champ intense sur les mêmes échantillons qui ont été utilisés pour enregistrer les spectres à 9 GHz.

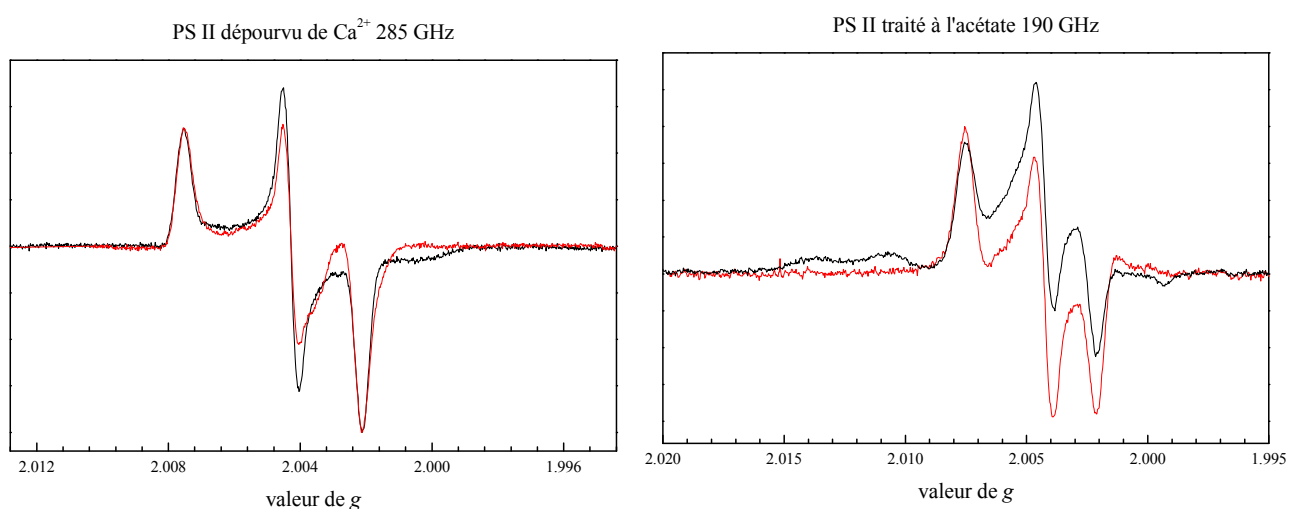
Dans le cas des échantillons dépourvus de calcium, un signal large unique apparaît centré à environ 9 mT au dessus du champ correspondant au signal à  $g_Z$  de  $Y_D^{\bullet}$  sur le spectre à 285 GHz. A 190 et 95 GHz un signal semblable est observé à champ plus fort que la zone de résonance de  $Y_D^{\bullet}$ . A champ plus faible, il semble que des signaux commencent à apparaître juste au-dessus du niveau du bruit. Par comparaison, les spectres à champ intense obtenus pour les échantillons traités à l'acétate sont très différents des spectres correspondants enregistrés dans les échantillons dépourvus de calcium. La majeure partie des signaux apparaît à champ plus faible que la zone de résonance de  $Y_D^{\bullet}$ . A 285 GHz, le signal large principal est centré à environ 20 mT en dessous de la valeur de champ correspondant au signal à  $g_X$  de  $Y_D^{\bullet}$ . A 190 GHz, deux signaux sont visibles à 20 et 10 mT du signal à  $g_X$  de  $Y_D^{\bullet}$  du côté bas champ. Un troisième pic est visible du côté haut champ à 9 mT au-dessus du signal à  $g_Z$  de  $Y_D^{\bullet}$ . A 95 GHz, un signal large apparaît de chaque côté du signal de  $Y_D^{\bullet}$ . Trois des six raies hyperfines du signal RPE du Mn(II) sont également observées sur ce spectre. Le signal du Mn(II) est absent des spectres enregistrés à 190 et 285 GHz à cause de la dépopulation thermique du niveau excité  $S_{Mn(II)} = 1/2$  responsable du signal. Les spectres RPE ont également été enregistrés pour des préparations de centres réactionnels (cores) de PS II traités à l'acétate. Dans ces préparations, les deux pics principaux du signal observé à 9 GHz sont séparés de 21 mT ; le signal est plus étroit de 2 mT par rapport à celui observé dans les préparations membranaires de PS II et reflète un couplage légèrement plus faible entre le radical et le cluster



**Figure 3.** Spectres RPE de l'état  $S_2YZ^{\bullet}$  dans les centres réactionnels de PS II traités à l'acétate. Conditions expérimentales : (285 GHz)  $\nu_{mw} = 284.9361$  GHz, amplitude de modulation 2 mT, fréquence de modulation 3318 Hz, température  $T = 2.5$  K, constante de temps 300 ms ; (9 GHz)  $\nu_{mw} = 9.464$  GHz, amplitude de modulation 2 mT, fréquence de modulation 100 kHz, température  $T = 7$  K, constante de temps 80 ms.

métallique. Les spectres obtenus à 285 et 9 GHz pour les préparations de centres réactionnels sont représentés sur la figure 3. A 285 GHz, le signal visible du côté bas champ est centré à 15 mT du signal à  $g_X$  de  $Y_D^\bullet$ , plus proche que dans le cas des membranes.

Tous ces signaux apparaissent de façon reproductible dans les spectres à champ intense enregistrés pour des échantillons différents de chaque type de préparation qui possède le signal dédoublé bien caractérisé à 9 GHz. Après adaptation à l'obscurité des échantillons à 193 K, ces signaux disparaissent complètement et peuvent être réinduits par éclairage à 273 K. Ces signaux sont attribués à l'état  $S_2Y_Z^\bullet$ ; ils proviennent de l'interaction magnétique entre le radical  $Y_Z^\bullet$  et le cluster à manganèse. La position en champ et l'étendue spectrale des signaux sont reproductibles pour plusieurs types d'échantillons correspondant à une préparation donnée. Des signaux contaminants peuvent être facilement identifiés par leur valeur de  $g$  qui est bien résolue pour des champs intenses. Il n'y a pas de preuve de signaux provenant de radicaux de chlorophylle. De tels signaux sont étroits même à 285 GHz et situés dans une région entre 2.0022 et 2.0035. Aucun signal du cytochrome  $b_{559}$  n'est attendu dans la région de champ utilisée pour l'enregistrement des spectres. Cependant, les détails de la forme du signal attribué à  $S_2Y_Z^\bullet$  sont parfois affectés par la distorsion de la ligne de base à proximité du signal de  $Y_D^\bullet$  qui sature rapidement avec la puissance micro-onde (voir par exemple sur la figure 4 dans le cas des échantillons traités à l'acétate). Le signal de  $Y_D^\bullet$  sature beaucoup plus rapidement que le signal de l'état  $S_2Y_Z^\bullet$ . Les propriétés de



**Figure 4.** Deux exemples de spectres RPE pleine échelle de l'état  $S_2Y_Z^\bullet$  dans les membranes de PS II traitées à l'acétate (à droite) et dépourvues de calcium (à gauche). Traits en noir : spectres après piégeage de l'état  $S_2Y_Z^\bullet$ , traits en rouge : spectres après adaptation à l'obscurité.

saturation (et donc la distorsion du signal) du radical  $Y_D^\bullet$  dépendent des autres espèces paramagnétiques présentes dans l'échantillon<sup>31</sup>. Par conséquent, il n'a pas été possible d'obtenir des spectres fiables de différence entre les échantillons éclairés (état  $S_2Y_Z^\bullet$  piégé) et adaptés à l'obscurité. Cependant, ceci n'a pas empêché l'observation ni une bonne caractérisation du signal de l'état  $S_2Y_Z^\bullet$  à toutes les fréquences utilisées. La figure 4 montre deux exemples de spectres après éclaircissement pour piéger l'état  $S_2Y_Z^\bullet$  et après adaptation à l'obscurité. Le signal correspondant à  $S_2Y_Z^\bullet$  est clairement visible même avec une échelle des ordonnées qui permet d'observer le signal de  $Y_D^\bullet$  dans son intégralité.

#### IV. DETERMINATION DES PARAMETRES DE COUPLAGE

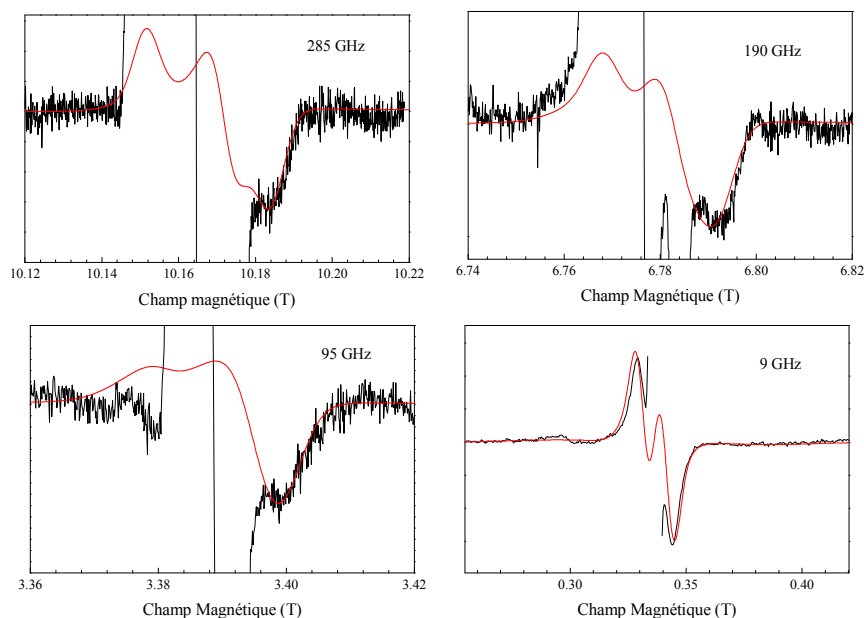
Afin d'estimer de façon quantitative les paramètres de couplage, des simulations des spectres expérimentaux ont été faites. Les valeurs de  $g$  pour le radical tyrosyle ont été prises des spectres à 285 GHz de  $Y_D^\bullet$  et fixées. L'hypothèse est faite qu'il n'y a pas de changement dans les valeurs de  $g$  du radical, bien que la proximité du cluster métallique puisse en principe avoir une influence par effet électrostatique<sup>32</sup>. Les valeurs de  $g$  et les couplages hyperfins pour le cluster à manganèse ne sont pas connus de façon

précise. Comme point de départ des simulations, l'interaction hyperfine pour le cluster a été modélisée par une distribution gaussienne.

La fonction de distribution a été choisie afin de représenter l'enveloppe et l'étendue en champ du signal multiligne observée dans

l'état  $S_2$  des préparations natives de PS II. Les simulations utilisant cette

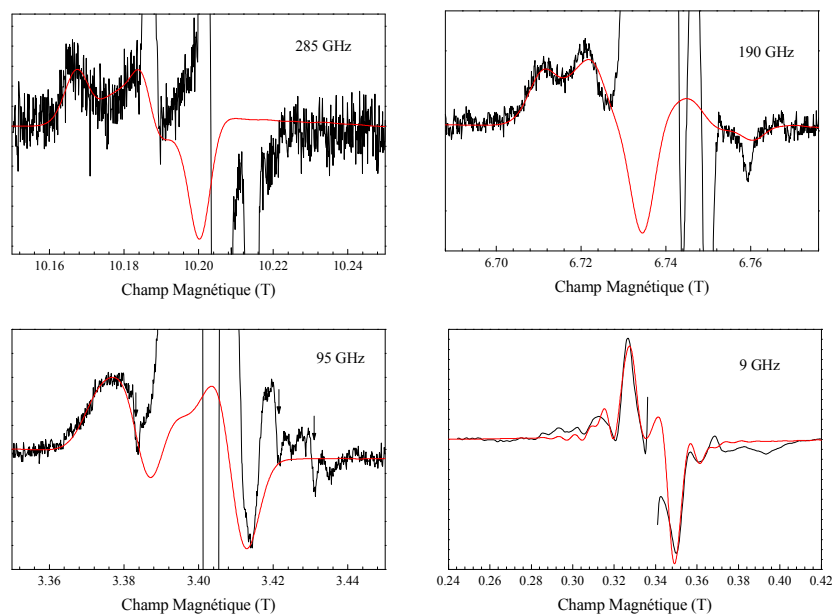
approche sont pratiquement identiques à celle effectuées en utilisant un Hamiltonien hyperfin



**Figure 5.** simulations des spectres RPE obtenus pour l'état  $S_2Y_Z^\bullet$  dans les membranes de PS II dépourvues de calcium. Les paramètres utilisés pour les simulations sont regroupés dans le tableau 1.

complet (voir plus loin). Ceci démontre que les portions du spectre qui correspondent à des transitions appartenant de façon prédominante au radical sont insensibles au détail des couplages hyperfins du cluster métallique. Comme attendu, les valeurs de  $g$  du cluster ont un effet beaucoup plus important sur les simulations des spectres à champ intense (voir plus loin). Cependant, les simulations ont d'abord été faites en gardant les valeurs de  $g$  du cluster constantes et les paramètres variables étaient  $J$ ,  $D$  et les deux angles  $\theta$  et  $\phi$  définissant l'orientation du vecteur dipôle-dipôle dans le système d'axes principaux du tenseur  $g$ . A 9 GHz, ces angles ont un effet négligeable sur la forme générale des spectres simulés mais leur influence augmente avec la fréquence. Les angles ont été déterminés par inspection visuelle des spectres simulés à haute fréquence. Le spectre obtenu à 190 GHz pour les préparations traitées à l'acétate a été particulièrement utile dans ce travail parce qu'il présente des signaux visibles correspondant à l'éclatement de chacune des trois composantes du tenseur  $g$  pour le radical tyrosyle (voir figure 4).

Les meilleures simulations obtenues sont représentées sur les figures 5 et 6 pour les préparations dépourvues de calcium et traitées à l'acétate respectivement. Dans les préparations dépourvues de calcium, les valeurs obtenues pour les couplages sont  $J = -0.42$  GHz et  $D = -0.1$  GHz. La valeur négative pour le couplage d'échange indique que le radical tyrosyle et le cluster à manganèse sont couplés de façon antiferromagnétique (spins anti-parallèles). Dans le cas



**Figure 6.** simulations des spectres RPE obtenus pour l'état  $S_2Y_Z^*$  dans les membranes de PS II traitées à l'acétate. Les paramètres utilisés pour les simulations sont regroupés dans la table 1. Sur le spectre à 95 GHz, les flèches indiquent la position du signal RPE provenant de  $Mn^{2+}$  contaminant.

des échantillons traités à l'acétate, les valeurs des couplages sont  $J = 0.82$  GHz et  $D = -0.12$  GHz. Contrairement au cas des préparations dépourvues de calcium, le couplage entre le radical et le cluster est ferromagnétique (spins parallèles). Dans le cas des préparations de centres réactionnels



traitées à l'acétate, le couplage est plus faible ( $J = 0.66$  GHz et  $D = -0.11$  GHz) en accord avec une réduction de la largeur du signal RPE. Cependant le couplage reste ferromagnétique dans ce type de préparation.

Dans le cas des échantillons traités à l'acétate, les variations de largeur du signal observées à 9 GHz entre les préparations membranaires et les préparations de centres réactionnels sont également observées à champ intense. Dans le cas des préparations dépourvues de calcium, des largeurs différentes sont observées à 9 GHz suivant le protocole expérimental utilisé pour enlever le calcium et la présence ou l'absence des polypeptides extrinsèques de 17 et 23 kDa qui se lient sur le côté donneur de la protéine. Dans ce cas, la variation dans la largeur du signal ne correspond pas à une différence observable sur le signal large obtenu à haut champ. Afin d'obtenir des simulations satisfaisantes à toutes les fréquences, il a été nécessaire d'utiliser une distribution du couplage d'échange.

La distribution a été modélisée par une gaussienne de mi-largeur  $\sigma_J$  à mi-hauteur. Sans cette distribution, le couplage requis pour simuler correctement les spectres à champ intense était trop grand pour reproduire les données enregistrées à 9 GHz. L'effet principal de cette distribution observée dans les simulations est donc un rétrécissement de la largeur pic à pic du signal à 9 GHz alors que les spectres à champ intense ne sont pratiquement pas affectés. Les valeurs utilisées pour la distribution sont indiquées dans la table 1 avec les autres paramètres des simulations.

## V. EFFETS DES VALEURS DE $g$ ET DES COUPLAGES HYPERFINS DU CLUSTER METALLIQUE

Les valeurs de  $g$  pour le cluster métallique ont un effet notable sur les spectres simulés du signal de l'état  $S_2Y_Z^\bullet$  à champ intense. Les données obtenues à plusieurs fréquences dans l'intervalle 9-285 GHz ont fourni de nombreuses contraintes pour les simulations. Il a ainsi été possible de faire varier les valeurs de  $g$  pour le cluster et d'obtenir celles qui produisaient les meilleures simulations. Les valeurs sont reportées dans la table 1, elles sont proches de la symétrie axiale.

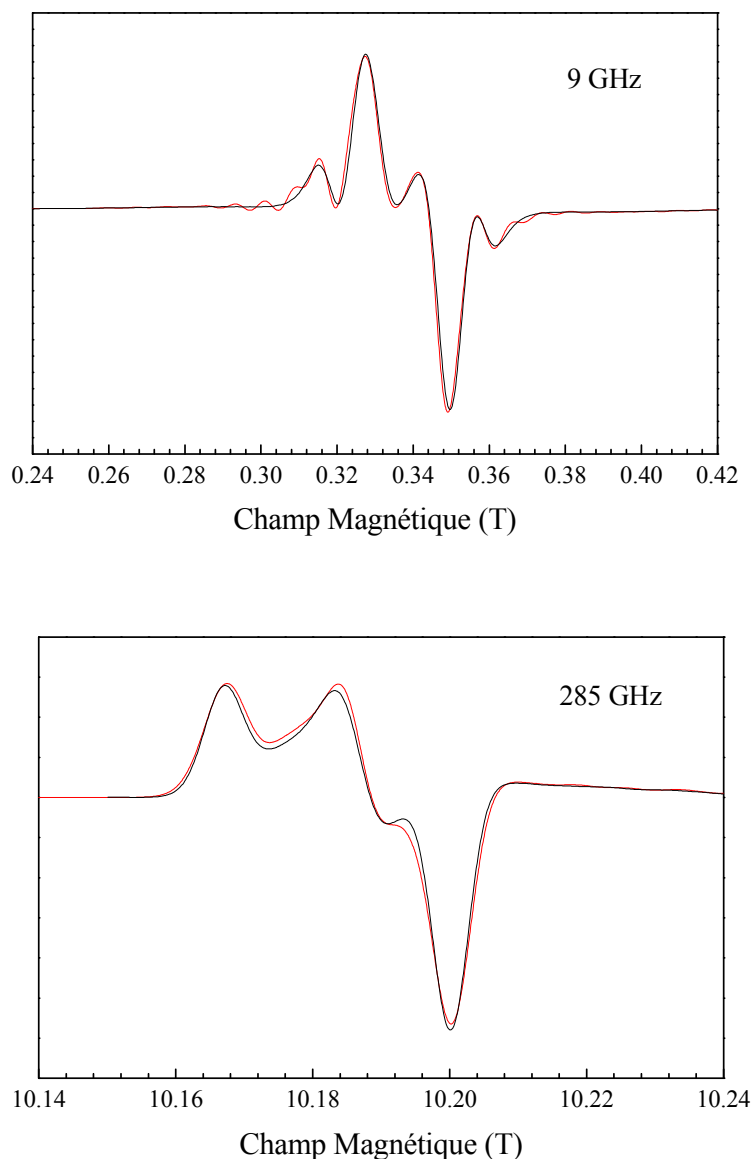
L'amplitude totale des couplages hyperfins pour le cluster à manganèse est du même ordre de grandeur que les paramètres de couplage spin-spin, il est donc important d'inclure le terme hyperfin du cluster dans l'Hamiltonien afin de décrire correctement l'état  $S_2Y_Z^\bullet$ . A 95 GHz ainsi qu'aux

fréquences supérieures, les raies hyperfines pour le centre métallique ne sont pas résolues dans le spectre RPE du système couplé et contribuent à la largeur des raies observées. A 9 GHz cependant, dans le cas des préparations traitées à l'acétate, un signal multiligne sous-jacent est observé dû aux couplages hyperfins du  $^{55}\text{Mn}$ .

Radical Tyrosyle				
Valeurs de g	$g_x = 2.0075$	$g_y = 2.0043$	$g_z = 2.0021$	
Cluster à Manganèse				
Valeurs de g	$g_x = 1.9967$	$g_y = 1.9955$	$g_z = 1.9600$	
Couplages hyperfins (en MHz) (échantillons traités à l'acétate)	$a_{1x} = 180$ $a_{2x} = 270$ $a_{3x} = 270$ $a_{4x} = 270$	$a_{1y} = 180$ $a_{2y} = 270$ $a_{3y} = 270$ $a_{4y} = 270$	$a_{1z} = 260$ $a_{2z} = 210$ $a_{3z} = 200$ $a_{4z} = 230$	
Couplages hyperfins (en MHz) (échantillons dépourvus de calcium)		$a_{1iso} = 420$ $a_{2iso} = 210$ $a_{3iso} = 148$ $a_{4iso} = 136$		
Interaction (Couplages en MHz)				
Membranes PS II traitées à l'acétate	$J = + 820 (\sigma_J = 40)$	$D = - 120$	$\theta = 90^\circ$	$\varphi = 0^\circ$
Cores PS II traités à l'acétate	$J = + 680 (\sigma_J = 40)$	$D = - 110$	$\theta = 90^\circ$	$\varphi = 0^\circ$
Membranes PS II dépourvues de calcium	$J = - 420 (\sigma_J = 150)$	$D = - 100$	$\theta = 90^\circ$	$\varphi = 0^\circ$

**Tableau 1.** Valeurs des différents paramètres utilisés pour les simulations des spectres RPE.

En modélisant le terme hyperfin par une distribution gaussienne, l'enveloppe du signal est obtenue mais la structure multiligne est perdue. Pour reproduire les détails de la forme du signal, le calcul complet utilisant les valeurs discrètes pour le couplage doit être utilisé. Le calcul utilisant la distribution gaussienne est cependant beaucoup plus rapide que le calcul complet et permet de déterminer avec une bonne précision les paramètres de couplage. La figure 7 compare les spectres simulés obtenus à 9 et 285 GHz en utilisant soit la distribution gaussienne pour modéliser le terme hyperfin du cluster soit le calcul complet. Toutes les autres simulations présentées ont été faites avec le calcul complet du couplage hyperfin. Les valeurs sont reportées dans la table 1. Pour les échantillons dépourvus de calcium, les valeurs hyperfines ont été prises dans la littérature et choisies pour rendre compte du signal multiligne stable à l'obscurité présent dans l'état  $S_2$  modifié de ces préparations<sup>6</sup>. Dans le cas des préparations traitées à l'acétate, les valeurs des couplages hyperfins ont été choisies pour reproduire la position des raies observées à 9 GHz pour le signal multiligne sous-jacent présent dans l'état  $S_2Y_Z^*$ . Cependant cet ensemble de valeurs n'est probablement pas unique.



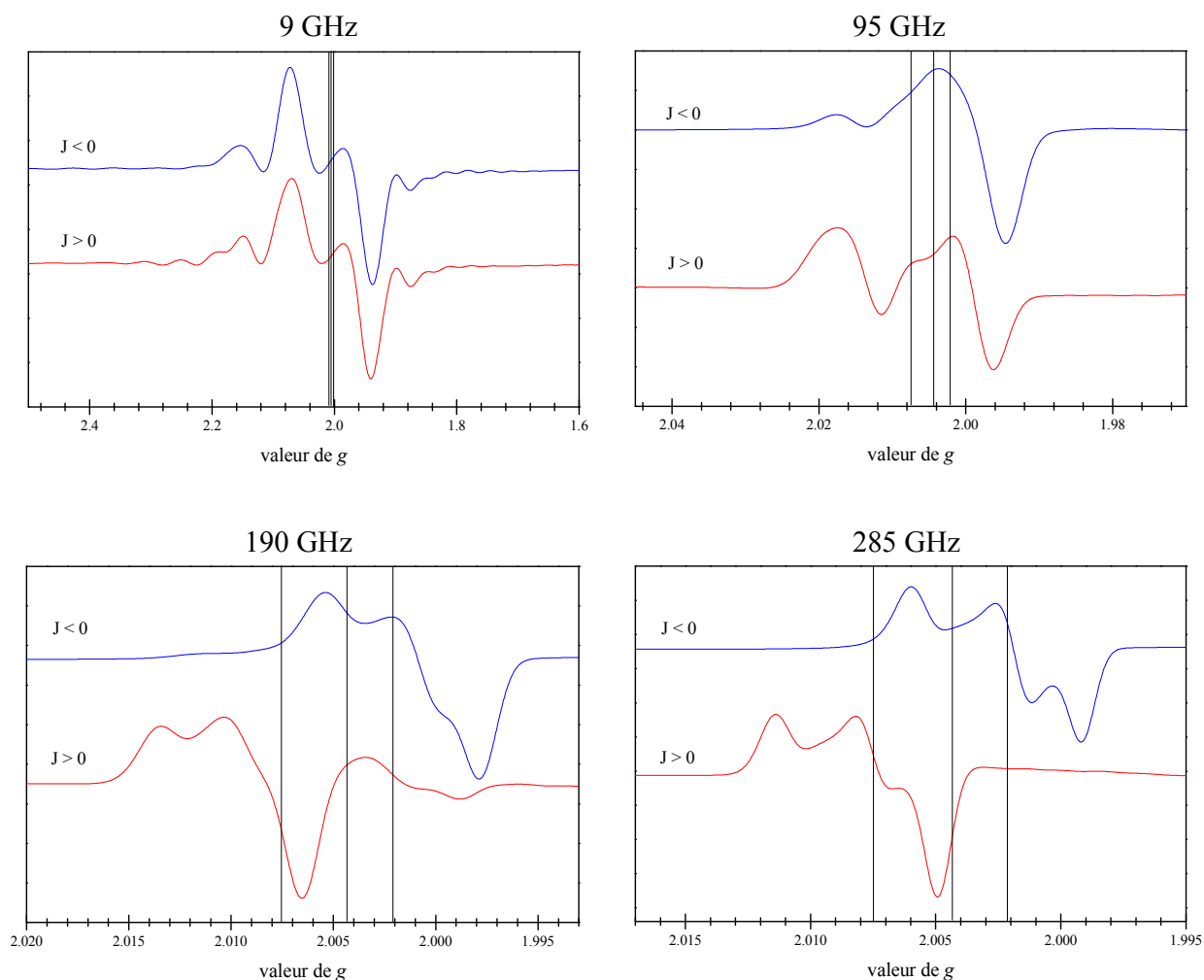
**Figure 7.** Comparaison des simulations calculées en utilisant soit le terme hyperfin complet (en rouge) soit une distribution gaussienne pour rendre compte du couplage hyperfin du cluster à manganèse (en noir).

## VI. INTERPRETATION DES RESULTATS

Les spectres RPE à champ intense ont été enregistrés à une température de 4.2 K ou moins, ce qui correspond à une énergie Boltzmann  $kT$  de 87.5 GHz. Ainsi, pour les spectres enregistrés à haute fréquence (190 et surtout 285 GHz) seul l'état fondamental du système couplé va être peuplé de façon significative. Les transitions issues de niveaux Zeeman excités ne seront pas observées ou donneront des signaux de faibles amplitudes (voir Schéma 1). Les transitions qui ont un caractère métallique dominant n'ont pas été observées probablement à cause d'une sensibilité insuffisante. Le signal provenant du cluster métallique est très large et donc faible en amplitude. Les signaux observés pour l'état  $S_2Y_Z^*$  proviennent principalement des transitions correspondant au radical en l'absence d'interaction (transitions à caractère radicalaire dominant). Il a été montré dans la partie théorique que la position du signal pour le système couplé par rapport au signal de  $Y_D^*$ , qui est un modèle pour le radical en absence d'interaction, permet de déterminer directement le signe de l'interaction. Il est donc clair, d'après les spectres à champ intense, que le signe de l'interaction change entre les préparations dépourvues de calcium et celles traitées à l'acétate. Puisque l'interaction d'échange est dominante, on peut en conclure que le couplage entre le radical  $Y_Z^*$  et le cluster à manganèse est ferromagnétique dans les préparations traitées à l'acétate et antiferromagnétique dans les préparations dépourvues de calcium.

Brudvig et ses collaborateurs ont publié une étude du signal RPE de l'état  $S_2Y_Z^*$  à 9 et 33 GHz pour les préparations traitées à l'acétate<sup>24</sup> et ils concluent que l'interaction est antiferromagnétique. Cette conclusion est basée sur l'observation de détails de la forme du signal à 9 GHz. Dans notre travail, le signe de l'interaction est déterminé directement à partir des spectres RPE enregistrés à 190 et 285 GHz. Pour des champs élevés, le signe de l'interaction sur le signal a un effet très fortement marqué. Des signaux sont soit présents soit absents et il est très clair que n'importe quel jeu de paramètres utilisant un couplage antiferromagnétique ne permet pas de simuler correctement les données obtenues pour les échantillons traitées à l'acétate. Nos paramètres permettent de simuler correctement les données obtenues à quatre fréquences différentes ainsi que les données à 33 GHz obtenues par Brudvig. La figure 8 montre les spectres simulés avec un paramètre d'échange positif ou négatif en gardant constant les autres paramètres de calcul. Les spectres à basses fréquences sont semblables et ne permettent pas de trancher de façon définitive entre une interaction ferromagnétique ou antiferromagnétique. Par contre les spectres à hautes fréquences diffèrent de façon marquée et permettent la détermination du signe de l'interaction sans ambiguïté.

Bien que moins courants que les couplages antiferromagnétiques, des cas de couplages ferromagnétiques entre un radical et un centre métallique dans une protéine ont été rapportés dans la littérature<sup>33-35</sup>. Dans le composé I de la cytochrome *c* peroxydase, un radical tryptophanyle est faiblement couplé à une espèce oxoferryle ( $S=1$ ). Il a été montré<sup>33</sup> que le couplage est distribué et



**Figure 8.** Spectres calculés pour une interaction ferromagnétique et antiferromagnétique entre le radical et le cluster métallique. Les paramètres utilisés sont ceux du tableau à l'exception du signe du paramètre  $J$  qui est indiqué pour chaque spectre. Les lignes verticales indiquent la position des valeurs principales de  $g$  pour le radical tyrosyle non couplé.

des contributions ferromagnétique et antiferromagnétique sont présentes mais le couplage ferromagnétique est globalement majoritaire. La présence des deux contributions a été expliquée par une distribution bimodale des sous-états de conformation de la protéine en solution gelée. L'hypothèse a été faite que la différence dans le signe de l'interaction provient de différences dans le recouvrement des orbitales sur le chemin d'échange entre le radical tryptophanyle et l'hème dues à une distribution dans la conformation de la protéine<sup>33</sup>. Ce couplage dans la cytochrome *c*

peroxydase est étudié dans le chapitre suivant. Dans le cas du PS II étudié ici, le couplage est soit ferromagnétique soit antiferromagnétique suivant le type de traitement effectué, les deux formes de couplages ne sont pas observées simultanément dans le même échantillon. Cependant, une distribution est également observée.

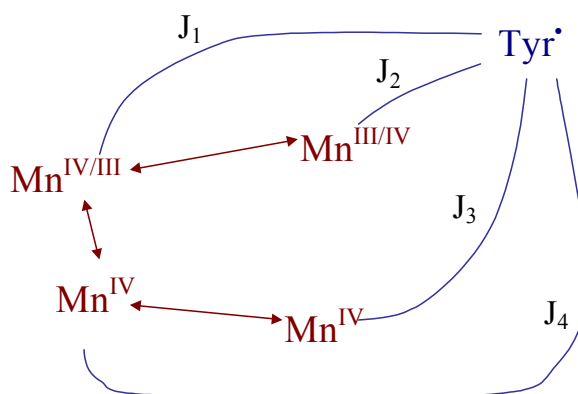
Dans les échantillons dépourvus de calcium, de bonnes simulations sont obtenues pour les trois plus hautes fréquences avec une faible distribution pour le paramètre  $J$ . A 9 GHz, cependant, la largeur pic à pic obtenue est trop grande comparée aux données expérimentales et une distribution relativement grande est nécessaire pour reproduire correctement les spectres expérimentaux à toutes les fréquences. Le besoin d'utiliser une distribution dans les paramètres de couplage a été couramment rapporté pour les interactions entre un centre métallique et un radical organique dans les protéines<sup>33,36-38</sup>. La distribution pour le paramètre d'échange reflète certainement une distribution de conformations de la protéine. Ce phénomène est connu et étudié dans les systèmes coopératifs (protéines, acides nucléiques, verres) pour lesquels une distribution d'états structuraux (appelés sous-états) est utilisée<sup>39,40</sup>. Chacun des sous-états est séparé de ses voisins par une barrière de faible énergie. En solution, l'interconversion entre les sous-états est très rapide et la conformation du site protéique est la moyenne de tous les sous-états. Lorsqu'on diminue la température pour piéger l'état  $S_2Y_Z^*$ , chaque site se fige dans un sous-état donné dont la géométrie varie d'une protéine à l'autre conduisant ainsi à une distribution globale observée spectroscopiquement. Les échantillons traités à l'acétate ont une distribution apparente plus faible et semble être mieux défini du point de vue structural.

Il y a au moins deux explications pour la différence de signe du couplage spin-spin observé entre les préparations traitées à l'acétate et les préparations dépourvues de calcium. Tout d'abord, les différences dans les constantes de couplage effectif peuvent refléter des différences dans un ou plusieurs des quatre couplages entre le radical et le cluster métallique (voir équation 3.17). Pour mieux comprendre comment cela est possible, on peut s'appuyer sur un modèle de dimère de dimères du type analysé par Blondin et collaborateurs<sup>41</sup>. Dans ce modèle, le cluster de quatre ions manganèse est caractérisé par trois constantes de couplage d'échange (voir schéma 2) : un couplage entre les ions métalliques pour chaque dimère et un couplage entre les deux dimères. L'un des dimères est une paire  $Mn(III)-Mn(IV)$  et le second une paire  $Mn(IV)-Mn(IV)$ . Dans la configuration pour laquelle l'interaction à l'intérieur d'un dimère est antiferromagnétique, la contribution de la paire  $Mn(IV)-Mn(IV)$  est nulle et le couplage effectif entre un radical et un tel cluster s'écrit  $2J_{III}-J_{IV}$ <sup>41</sup>. Dans ce cas, une possibilité est que le couplage de spin dans un type

d'échantillon soit caractérisé par une interaction  $Mn(III)-Rad^*$  et par une interaction  $Mn(IV)-Rad^*$  pour l'autre type d'échantillon. Ceci conduit à un changement dans le signe et l'amplitude du couplage effectif, même lorsque le signe et l'amplitude des couplages intrinsèques restent constants.

Une autre explication possible pour le changement de signe du couplage effectif est que les coefficients  $K_i$  eux-mêmes soient différents à cause de changements dans la structure électronique du cluster à manganèse. Cette possibilité est intéressante lorsqu'on sait qu'aucun signal multiligne n'est observé pour l'état  $S_2$  des échantillons traités à l'acétate alors qu'un signal multiligne stable à l'obscurité est présent dans les échantillons dépourvus de calcium. Le fait qu'un signal multiligne

sous-jacent soit observé lors de la formation de l'état  $S_2Y_Z^*$  dans les préparations traitées à l'acétate est une preuve supplémentaire que la structure électronique du cluster subit des modifications significatives. Si la structure électronique du cluster à manganèse est différente dans les deux types d'échantillons, il paraît raisonnable que les



**Schéma 2.** Représentation des diverses interactions au niveau du complexe mangano-tyrosyle.

couplages d'échanges individuels entre le radical et chacun des ions métalliques soient également modifiés. Les informations contenues dans les spectres expérimentaux ne permettent pas de choisir entre ces différentes possibilités, cependant le changement de signe du couplage effectif implique que les systèmes en interaction dans chaque type de préparation soient distincts. Les différences proviennent de modifications dans la structure électronique du cluster ou dans les interactions individuelles entre les différents spins ou bien une combinaison des deux. Dans tous les cas, les modèles du site actif qui tentent de comparer ces deux systèmes doivent tenir compte de ces différences.

Un des aspects intéressants dans l'étude des systèmes couplés est la possibilité de déduire des informations structurales (distances en particulier) entre les espèces en interaction à partir de la contribution anisotrope (dipolaire) du couplage. Dans cette étude, l'approximation point-dipôle a

été utilisée et les valeurs obtenues pour le paramètre  $D$  permettent de calculer une distance de 8.6 Å à 9.2 Å entre le radical et le cluster, en accord avec des études précédentes. Cependant, comme discuté plus haut, l'interaction dipolaire est également un paramètre effectif qui dépend fortement de la structure électronique des deux espèces en interaction et n'est donc pas nécessairement axiale. Fournel et collaborateurs ont montré<sup>38</sup> que dans des traitements plus détaillés qui prennent en compte la distribution des spins, il n'est pas possible de calculer une distance à cause de l'impossibilité de séparer la contribution d'échange de la contribution dipolaire. Ainsi, les distances obtenues dans les simulations sont des distances effectives entre spins. Il n'y a pas suffisamment d'informations pour calculer une distance géométrique exacte entre le radical et le cluster, et la géométrie du cluster n'est elle-même pas connue de façon certaine. Cependant les valeurs des couplages effectifs obtenues de même que le besoin de considérer les distributions locales des spins impliquent que la tyrosine  $Z$  et le cluster à manganèse sont proches.

## VII. CONCLUSION

Cette étude démontre l'importance d'utiliser une approche multifréquence dans l'étude des systèmes couplés. L'utilisation de la RPE à champ intense pour les systèmes de deux spins  $S = 1/2$  couplés permet la détermination directe du signe de l'interaction entre les deux espèces et permet ainsi de conclure quant à la nature ferromagnétique ou antiferromagnétique de cette interaction. En utilisant un modèle simple pour l'Hamiltonien décrivant le système, nous avons simulé les spectres RPE obtenus à quatre fréquences différentes pour le système du radical tyrosyle  $Z$  en interaction avec le cluster à manganèse dans des préparations inhibées de PS II. Cette approche a permis de déterminer avec précision les paramètres effectifs de couplage et de mettre en évidence la présence d'une distribution au niveau de cette interaction, en particulier dans le cas des préparations dépourvues de calcium. L'interprétation des données et les implications électroniques et structurales pour le complexe mangano-tyrosyle sont encore incomplètes mais la connaissance de la structure cristallographique qui devrait être résolue dans un futur proche devrait permettre d'approfondir les calculs et l'analyse des données sur des bases fiables et d'en retirer davantage d'informations sur la structure électronique et les paramètres de spin du système.



## RÉFÉRENCES

- [1] DISMUKES, G. C. & SIDERER, Y. (1981) Intermediates of a polynuclear manganese center involved in photosynthetic water oxidation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**, 274-278.
- [2] RUTHERFORD, A. W. & BOUSSAC, A. (1992) in *Research in Photosynthesis* (Murata, N., Ed.) Vol. II, pp 21-27. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- [3] DEBUS, R. J. (1992) The manganese and calcium ions of photosynthetic oxygen evolution. *Biochim Biophys Acta* **1102**, 269-352.
- [4] COLEMAN, W. J. (1990) Chloride binding proteins: mechanistic implications for the oxygen-evolving complex of photosystem II. *Photosynth Res* **23**, 1-27.
- [5] YOCUM, C. F. (1991) Calcium activation of photosynthetic water oxidation. *Biochim Biophys Acta* **1059**, 1-15.
- [6] BOUSSAC, A., ZIMMERMANN, J. L., RUTHERFORD, A. W. & LAVERGNE, J. (1990) Histidine oxidation in the oxygen-evolving photosystem II enzyme. *Nature* **347**, 303-306.
- [7] MACLACHLAN, D. J. & NUGENT, J. H. (1993) Investigation of the  $S_3$  electron paramagnetic resonance signal from the oxygen-evolving complex of photosystem 2: effect of inhibition of oxygen evolution by acetate. *Biochemistry* **32**, 9772-80.
- [8] SINCLAIR, J. (1984) The influence of anions on oxygen evolution by isolated spinach chloroplasts. *Biochim Biophys Acta* **764**, 247-252.
- [9] SANDUSKY, P. O. & YOCUM, C. F. (1986) The chloride requirement for photosynthetic oxygen evolution: factors affecting nucleophilic displacement of chloride from the oxygen-evolving complex. *Biochim Biophys Acta* **849**, 85-93.
- [10] GERKEN, S., DEKKER, J. P., SCHLODDER, E. & WITT, H. T. (1989) Studies on the multiphasic charge recombination between chlorophyll  $a_{II}^+$  ( $P_{680}^+$ ) and plastoquinone  $Q_A^-$  in photosystem II complexes. Ultraviolet difference spectrum of  $Chl-a_{II}^+/Chl-a_{II}$ . *Biochim Biophys Acta* **977**, 52-61.
- [11] KÜHNE, H., SZALAI, V. A. & BRUDVIG, G. W. (1999) Competitive binding of acetate and chloride in photosystem II. *Biochemistry* **38**, 6604-13.
- [12] BOUSSAC, A., SETIF, P. & RUTHERFORD, A. W. (1992) Inhibition of tyrosine Z photooxidation after formation of the  $S_3$  state in  $Ca^{2+}$ -depleted and  $Cl^-$ -depleted photosystem II. *Biochemistry* **31**, 1224-34.
- [13] ANDREASSON, L. E. & LINDBERG, K. (1992) The inhibition of photosynthetic oxygen evolution by ammonia probed by EPR. *Biochim Biophys Acta* **1100**, 177-183.
- [14] ONO, T. & INOUE, Y. (1990) Abnormal redox reactions in photosynthetic  $O_2$ -evolving centers in NaCl/EDTA-washed PS II. A dark-stable EPR multiline signal and an unknown positive charge accumulator. *Biochim Biophys Acta* **1020**, 269-277.

- [15] BOUSSAC, A., ZIMMERMANN, J. L. & RUTHERFORD, A. W. (1989) EPR signals from modified charge accumulation states of the oxygen evolving enzyme in  $Ca^{2+}$ -deficient photosystem II. *Biochemistry* **28**, 8984-9.
- [16] HALLAHAN, B. J., NUGENT, J. H., WARDEN, J. T. & EVANS, M. C. (1992) Investigation of the origin of the "S<sub>3</sub>" EPR signal from the oxygen-evolving complex of photosystem 2: the role of tyrosine Z. *Biochemistry* **31**, 4562-73.
- [17] BOUSSAC, A. & RUTHERFORD, A. W. (1992) The origin of the split S<sub>3</sub> EPR signal in  $Ca^{2+}$ -depleted photosystem II: histidine versus tyrosine. *Biochemistry* **31**, 7441-5.
- [18] GILCHRIST, M. L., JR., BALL, J. A., RANDALL, D. W. & BRITT, R. D. (1995) Proximity of the manganese cluster of photosystem II to the redox-active tyrosine  $Y_Z$ . *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 9545-9.
- [19] TANG, X. S., RANDALL, D. W., FORCE, D. A., DINER, B. A. & BRITT, R. D. (1996) Manganese-Tyrosine Interaction in the Photosystem II Oxygen-Evolving Complex. *J Am Chem Soc* **118**, 7638.
- [20] MACLACHLAN, D. J., NUGENT, J. H., WARDEN, J. T. & EVANS, M. C. (1994) Investigation of the ammonium chloride and ammonium acetate inhibition of oxygen evolution by photosystem II. *Biochim Biophys Acta* **1188**, 325-334.
- [21] FORCE, D. A., RANDALL, D. W. & BRITT, R. D. (1997) Proximity of acetate, manganese, and exchangeable deuterons to tyrosine  $Y_Z^{\bullet}$  in acetate-inhibited photosystem II membranes: implications for the direct involvement of  $Y_Z^{\bullet}$  in water-splitting. *Biochemistry* **36**, 12062-70.
- [22] PELOQUIN, J. M., CAMPBELL, K. A. & BRITT, R. D. (1998) <sup>55</sup>Mn pulsed ENDOR demonstrates that the Photosystem II "split" EPR signal arises from a magnetically-coupled manganese-tyrosyl complex. *Journal of the American Chemical Society* **120**, 6840-6841.
- [23] DORLET, P., DI VALENTIN, M., BABCOCK, G. T. & MCCracken, J. L. (1998) Interaction of  $Y_Z^{\bullet}$  with its environment in acetate-treated photosystem II membranes and reaction center cores. *Journal of Physical Chemistry B* **102**, 8239-8247.
- [24] LAKSHMI, K. V., EATON, S. S., EATON, G. R., FRANK, H. A. & BRUDVIG, G. W. (1998) Analysis of dipolar and exchange interactions between manganese and tyrosine Z in the S<sub>2</sub> $Y_Z^{\bullet}$  state of acetate-inhibited photosystem II via EPR spectral simulations at X- and Q-Bands. *Journal of Physical Chemistry B* **102**, 8327-8335.
- [25] SMITH, T. D. & PILBROW, J. R. (1974) The determination of structural properties of dimeric transition metal ion complexes from EPR spectra. *Coord. Chem. Rev.* **13**, 173-278.
- [26] EATON, S. S., MORE, K. M., SAWANT, B. M., BOYMEL, P. M. & EATON, G. R. (1983) Metal-nitroxyl interactions. 29. EPR studies of spin-labeled copper complexes in frozen solution. *J Magn Reson* **52**, 435-449.
- [27] HORE, P. J. (1989) in *Advanced EPR: Applications in Biology and Biochemistry* (Hoff, A. J., Ed.) Ch. 12. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.

- [28] HOGANSON, C. & BABCOCK, G. T. (1988) Electron-transfer events near the reaction center in  $O_2$ -evolving photosystem II preparations. *Biochemistry* **27**, 5848-5855.
- [29] BERTRAND, P., MORE, C., GUIGLIARELLI, B., FOURNEL, A., BENNET, B. & HOWES, B. (1994) Biological polynuclear clusters coupled by magnetic interactions: from the point dipole approximation to a local spin model. *J Am Chem Soc* **116**, 3078-3086.
- [30] BERTRAND, P., CAMENSULI, P., MORE, C. & GUIGLIARELLI, B. (1996) A Local Spin Model To Describe the Magnetic Interactions in Biological Molecules Containing  $[4Fe-4S]^+$  Clusters. Application to Ni-Fe Hydrogenases. *J Am Chem Soc* **118**, 1426.
- [31] UN, S., BRUNEL, L. C., BRILL, T. M., ZIMMERMANN, J. L. & RUTHERFORD, A. W. (1994) Angular orientation of the stable tyrosyl radical within photosystem II by high-field 245-GHz electron paramagnetic resonance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 5262-6.
- [32] UN, S., ATTA, M., FONTECAVE, M. & RUTHERFORD, A. W. (1995) g-values as a probe of the local protein environment: high-field EPR of tyrosyl radicals in ribonucleotide reductase and photosystem II. *Journal of the American Chemical Society* **117**, 10713-19.
- [33] HOUSEMAN, A. L., DOAN, P. E., GOODIN, D. B. & HOFFMAN, B. M. (1993) Comprehensive explanation of the anomalous EPR spectra of wild-type and mutant cytochrome c peroxidase compound ES. *Biochemistry* **32**, 4430-43.
- [34] BENECKY, M. J., FREW, J. E., SCOWEN, N., JONES, P. & HOFFMAN, B. M. (1993) EPR and ENDOR detection of compound I from *Micrococcus lysodeikticus* catalase. *Biochemistry* **32**, 11929-33.
- [35] PATTERSON, W. R., POULOS, T. L. & GOODIN, D. B. (1995) Identification of a porphyrin  $\pi$  cation radical in ascorbate peroxidase compound I. *Biochemistry* **34**, 4342-5.
- [36] STEVENSON, R. C., DUNHAM, W. R., SANDS, R. H., SINGER, T. P. & BEINERT, H. (1986) Studies on the spin-spin interaction between flavin and iron-sulfur cluster in an iron-sulfur flavoprotein. *Biochim Biophys Acta* **869**, 81-8.
- [37] RUTTER, R., VALENTINE, M., HENDRICH, M. P., HAGER, L. P. & DEBRUNNER, P. G. (1983) Chemical nature of the porphyrin  $\pi$  cation radical in horseradish peroxidase compound I. *Biochemistry* **22**, 4769-74.
- [38] FOURNEL, A., GAMBARELLI, S., GUIGLIARELLI, B., MORE, C., ASSO, M., CHOUTEAU, G., HILLE, R. & BERTRAND, P. (1998) Magnetic interactions between a  $[4Fe-4S]^+$  cluster and a flavin mononucleotide radical in the enzyme trimethylamine dehydrogenase: A high-field electron paramagnetic resonance study. *Journal of Chemical Physics* **109**, 10905-10913.
- [39] FRAUENFELDER, H., SLIGAR, S. G. & WOLYNES, P. G. (1991) The energy landscapes and motions of proteins. *Science* **254**, 1598-1603.
- [40] STEIN, D. (1987) in *Protein Structure: Molecular and Electronic Reactivity* pp 85-93. Springer-Verlag, New York.
- [41] BLONDIN, G., DAVYDOV, R., PHILOUZE, C., CHARLOT, M. F., STYRING, S., AKERMARK, B., GIRERD, J. J. & BOUSSAC, A. (1997) Electron paramagnetic resonance study of the  $S=1/2$

ground state of a radiolysis-generated manganese(III)-trimanganese(IV) form of  $[\text{Mn}_4^{\text{IV}}\text{O}_6(\text{bipy})_6]^{4+}$  (bipy=2,2'-bipyridine). Comparison with the photosynthetic Oxygen Evolving Complex. *Journal of the Chemical Society-Dalton Transactions* **21**, 4069-4074.

## CHAPITRE IV



### ETUDE DU COMPOSE I DE LA CYTOCHROME *c* PEROXYDASE

---

## CHAPITRE IV :

### ETUDE DU COMPOSE I DE LA CYTOCHROME C PEROXYDASE.

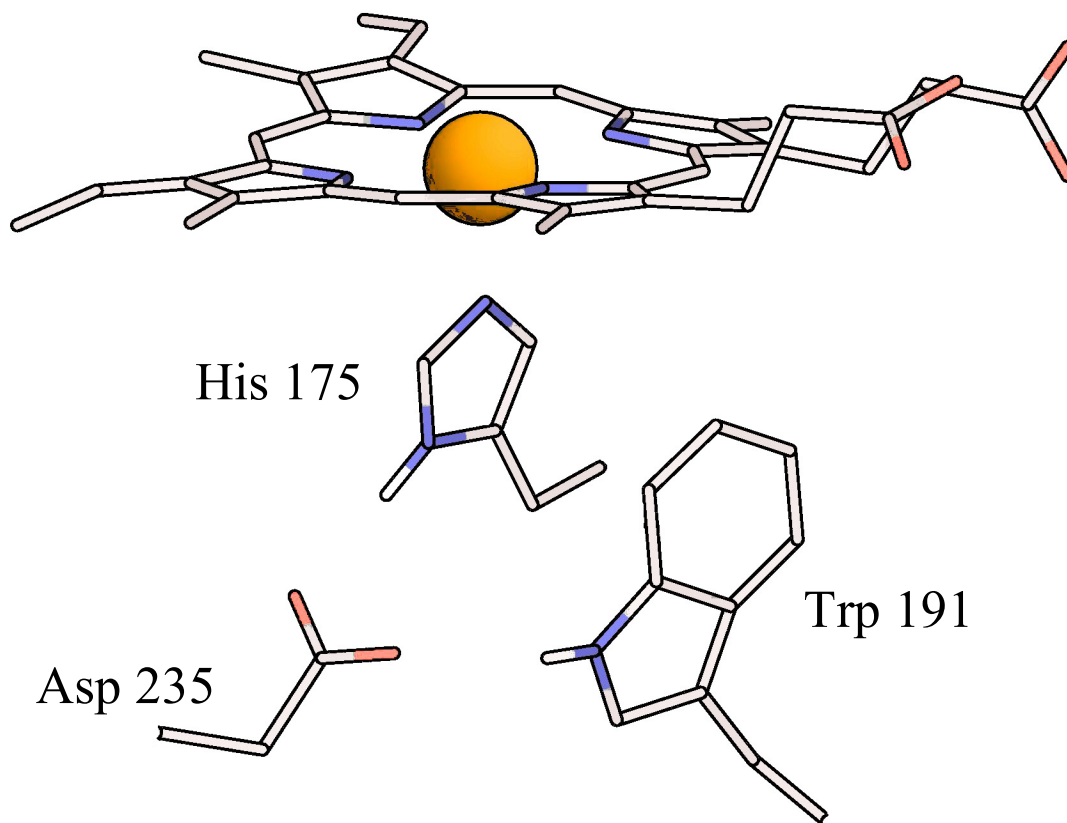
---

#### I. INTRODUCTION : LA CYTOCHROME c PEROXYDASE

De façon générale, les peroxydases sont des enzymes qui catalysent l'oxydation de substrats en utilisant le peroxyde d'hydrogène comme accepteur terminal d'électrons<sup>1</sup>. Dans le cas de la cytochrome c peroxydase (CcP), le substrat est le cytochrome c à l'état Fe(II). Le site catalytique des peroxydases à hème est constitué d'un groupe prosthétique Fe-protoporphyrine IX, le fer étant penta-coordiné et dans l'état d'oxydation +III haut spin pour l'état natif des enzymes. Le cinquième ligand est en général le groupe imidazole d'une histidine (voir figure 1). Une propriété des peroxydases est la formation d'un état intermédiaire hautement oxydant, appelé composé I, qui catalyse l'oxydation de divers substrats. Cet état intermédiaire provient de l'oxydation à deux électrons de l'enzyme native par une molécule de peroxyde d'hydrogène, c'est-à-dire l'oxydation de l'hème Fe(III) en une espèce oxoferryle Fe(IV)=O et la formation concomitante d'un radical. En général, le radical se forme au niveau de la porphyrine. Dans certains cas, dont celui de la CcP ou de la prostaglandine H synthase (voir chapitre V), cet état évolue par la réduction du radical porphyrinique par un résidu aminoacide voisin.

La caractérisation spectroscopique du composé I dans le cas de la cytochrome c peroxydase, combinée avec des études de mutagenèse dirigée, a permis d'identifier le site du radical à un résidu tryptophane, très probablement Trp191<sup>2</sup>. Différents mutants de la CcP ont été étudiés dans le but de tester l'importance et le rôle de résidus amino-acides particuliers pour l'activité catalytique de l'enzyme. Quelques exemples sont les mutations du ligand axial histidine (His175)<sup>3</sup> ou du résidu Asp235<sup>4</sup> qui sert de donneur de liaison hydrogène à His175 et Trp191. D'autre part, des mutants de la CcP ont été conçus pour réaliser des cavités servant à induire la fixation de substrats artificiels.

Par exemple, il a été montré que la mutation du résidu Trp191 en glycine crée un site de fixation pour des petits composés hétérocycliques<sup>5</sup>. En particulier, il a été montré que le mutant W191G de la CcP peut fixer et oxyder la molécule de 2-aminothiazole<sup>6</sup>. La figure 1 montre le site actif de l'enzyme dont la structure cristallographique a été déterminée.



**Figure 1.** Structure du site catalytique de la cytochrome c peroxydase. Cette figure a été réalisée en utilisant le programme Rasmol et le code PDB 1CCA.

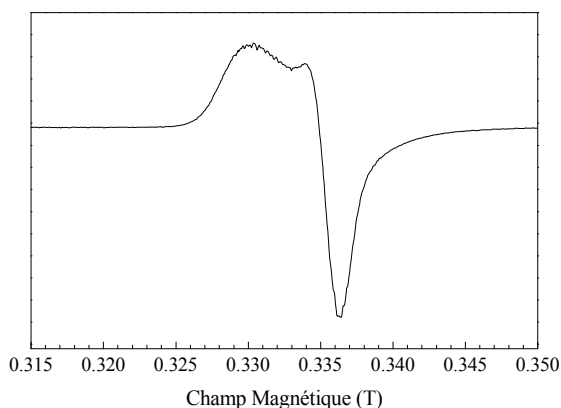
Le signal RPE axial observé pour le composé I de la cytochrome c peroxydase à 9 GHz est représenté sur la figure 2. Il a pu être modélisé par un couplage d'échange faible entre le radical tryptophanyle et l'espèce oxoferryle<sup>2</sup>, en incluant une distribution pour les valeurs de couplage<sup>7</sup>. Une telle distribution pour les couplages ferro et antiferromagnétique avait été invoquée auparavant pour expliquer le signal RPE très large observé pour l'intermédiaire radical porphyrinique dans le cas de la peroxydase de Raifort<sup>8</sup> ainsi que pour le signal RPE axial observé pour le composé I de la catalase de *Micrococcus lysodeikticus*<sup>9</sup>. Les changements de distribution pour le couplage

d'échange entre le radical tryptophanyle et l'espèce oxoferryle ont été directement corrélés aux changements observés dans le spectre RPE à 9 GHz du composé I pour les mutants His175<sup>3</sup> et Asp235 de la CcP.

Un nombre limité de composés intermédiaires pour les catalases et peroxydases à hème a été étudié en utilisant les spectroscopies RPE et ENDOR, deux techniques adaptées pour identifier spécifiquement la nature des espèces radicalaires. C'est le cas pour les catalases de

*Micrococcus luteus*<sup>9</sup>, de *Proteus mirabilis* et de foie de bœuf<sup>10,11</sup>, pour la chloroperoxydase<sup>12</sup>, la cytochrome c peroxydase<sup>2,13</sup>, la lignine peroxydase<sup>14</sup> et l'ascorbate peroxydase<sup>15</sup>. Pour certaines de ces enzymes, l'utilisation des techniques de mélange rapide et de freeze-quench, combinées avec la RPE, a permis la détection d'espèces radicalaires distinctes qui sont le résultat de l'oxydation séquentielle du macrocycle porphyrinique et d'un résidu amino-acide. Par exemple, un intermédiaire radical tyrosyle a été mis en évidence dans le cycle peroxydase de la prostaglandine H synthase<sup>16-18</sup> et pour le cycle catalytique de la catalase de foie de bœuf<sup>11</sup>. Le spectre RPE des radicaux d'acides aminés à 9 GHz est dominé par l'interaction hyperfine entre le spin électronique et le spin nucléaire des protons à proximité. La faible anisotropie du facteur g inhérente aux radicaux organiques n'est pas résolue dans les spectres RPE à champ conventionnel. Des champs magnétiques plus intenses (à partir de 3 T) sont requis pour résoudre l'anisotropie du tenseur g.

Dans le travail présenté ici, nous avons étudié plus en détails l'interaction entre le radical tryptophanyle et l'espèce oxoferryle du composé I de la cytochrome c peroxydase en combinant l'utilisation de la RPE à champ intense et des simulations spectrales. Il a également été possible de montrer clairement la présence transitoire d'un autre radical grâce aux spectres RPE à 285 GHz du composé I enregistrés pour différents temps de mélange de l'enzyme native avec le peroxyde d'hydrogène. Le composé I du mutant W191G de la CcP a également été caractérisé. Le spectre RPE à champ intense de l'unique radical observé dans ce cas présente des valeurs de g et des couplages hyperfins caractéristiques d'un radical tyrosyle. La composante large observée à  $g_x$  est



**Figure 2.** Spectre RPE à 9 GHz obtenu pour le composé I de la CcP. Conditions expérimentales :  $\nu_{mw}=9.437$  GHz ; amplitude de modulation 0.5 mT ; puissance 2 mW ;  $T=4$ K.



caractéristique d'un environnement électrostatique distribué comme observé dans la catalase de foie de boeuf ou les cristaux, irradiés aux rayons gamma, de tyrosine-HCl.

## II. PREPARATION DES ECHANTILLONS

Les échantillons de la CcP (MKT) sauvage (provenant de la levure) ont été obtenus par expression de la protéine dans *E. coli* au moyen du plasmide pT7CCP sous contrôle du promoteur T7. CcP-MKT de *E. coli* diffère du sauvage de la levure aux positions 53 et 152 ainsi qu'au niveau de la triade Met-Lys-Thr sur le N-terminal<sup>4</sup>. Le mutant W191G de la CcP a été construit par mutagenèse dirigée, surexprimé dans *E. coli* BL21(DE3), et purifié suivant le protocole décrit précédemment<sup>5</sup>. Le composé intermédiaire [(Fe(IV)=O)Trp<sup>•+</sup>] des échantillons de CcP a été préparé en mélangeant manuellement 2.5 mM d'enzyme native (dans un tampon 100 mM phosphate de potassium, pH 6.0) de façon équimolaire avec un même volume de peroxyde d'hydrogène (Sigma) directement dans un tube RPE de 4 mm de diamètre externe maintenu dans un mélange glace/eau. La réaction était stoppée par immersion du tube dans de l'azote liquide au bout du temps désiré.

Les cristaux de tyrosine-HCl ont été obtenus à température ambiante par évaporation lente d'une solution de L-tyrosine (Sigma) dissoute dans de l'acide chlorhydrique 30%. Les cristaux ont été irradiés avec une source de rayons gamma <sup>60</sup>Co en utilisant une dose de 7 kGy/h pendant une heure à température ambiante. Les échantillons pour les mesures de RPE à champ intense ont été préparés en broyant finement les cristaux et en faisant une suspension dans du nujol. Les échantillons ont été congelés dans l'azote liquide pour utilisation ultérieure.

## III. THEORIE

L'Hamiltonien qui décrit le système est:

$$\hat{H} = \beta \hat{S}^{\text{Rad}} \cdot \tilde{\mathbf{g}}^{\text{Rad}} \cdot \mathbf{H} + \beta \hat{S}^{\text{Fe}} \cdot \tilde{\mathbf{g}}^{\text{Fe}} \cdot \mathbf{H} + \hat{S}^{\text{Fe}} \cdot \tilde{\mathbf{D}} \cdot \hat{S}^{\text{Fe}} + \hat{S}^{\text{Rad}} \cdot \tilde{\mathbf{A}} \cdot \hat{S}^{\text{Fe}} \quad (\text{Eq. 4.1})$$

où  $\beta$  est le magnéton de Bohr,  $\mathbf{H}$  le champ magnétique appliqué,  $\tilde{\mathbf{g}}^{\text{Rad}}$  et  $\tilde{\mathbf{g}}^{\text{Fe}}$  les tenseurs  $\mathbf{g}$  pour chacune des espèces isolées Trp<sup>•+</sup> et Fe(IV)=O,  $\tilde{\mathbf{D}}$  est le tenseur d'éclatement en champ nul pour

l'espèce oxoferryle,  $\Delta$  est le tenseur de couplage entre les deux espèces et  $\mathbf{S}^{\text{Rad}}$  et  $\mathbf{S}^{\text{Fe}}$  sont les opérateurs de spin des deux espèces paramagnétiques. Pour les calculs, on choisit un système d'axes (X, Y, Z) dans lequel les tenseurs sont diagonaux. Ceci est réalisé en choisissant l'axe Z le long de la normale à l'hème ce qui correspond à l'axe de symétrie Z de l'éclatement en champ nul et, en bonne approximation, à la direction  $g_z$  de l'espèce oxoferryle ainsi qu'à la direction  $g_y$  du radical tryptophanyle. De part la symétrie de l'éclatement en champ nul, le choix des axes X et Y est libre dans le plan de l'hème. Les axes X et Y sont choisis en constatant que le plan du résidu tryptophane est pratiquement perpendiculaire au plan de l'hème et que la direction  $g_x$  du radical est, en bonne approximation, parallèle au plan de l'hème. Ainsi l'axe X est choisi pour coïncider avec la direction  $g_x$  du radical et l'axe Y pour coïncider avec la direction  $g_z$  du radical organique qui est elle-même perpendiculaire au plan du noyau indole. Dans ce système d'axes, les valeurs de  $g$  pour l'espèce oxoferryle sont  $g_x=g_y=2.25$  et  $g_z=1.98^{8,19}$ . Les valeurs de  $g$  du radical, conventionnellement reportées comme  $g_x=2.0031$ ,  $g_y=2.0028$  et  $g_z=2.0021^{20}$  s'écrivent  $g_x=2.0031$ ,  $g_y=2.0021$  et  $g_z=2.0028$ . Dans le système d'axes choisi, l'Hamiltonien peut-être développé de la façon suivante:

$$H = \beta \left( g_x^{\text{Rad}} \hat{S}_x^{\text{Rad}} H_x + g_y^{\text{Rad}} \hat{S}_y^{\text{Rad}} H_y + g_z^{\text{Rad}} \hat{S}_z^{\text{Rad}} H_z + g_x^{\text{Fe}} \hat{S}_x^{\text{Fe}} H_x + g_y^{\text{Fe}} \hat{S}_y^{\text{Fe}} H_y + g_z^{\text{Fe}} \hat{S}_z^{\text{Fe}} H_z \right) + D \left( \hat{S}_z^{\text{Fe}} \hat{S}_z^{\text{Fe}} - \frac{2}{3} \right) + \Delta_x \left( \hat{S}_x^{\text{Rad}} \hat{S}_x^{\text{Fe}} \right) + \Delta_y \left( \hat{S}_y^{\text{Rad}} \hat{S}_y^{\text{Fe}} \right) + \Delta_z \left( \hat{S}_z^{\text{Rad}} \hat{S}_z^{\text{Fe}} \right) \quad (\text{Eq. 4.2})$$

Le paramètre  $D$  a été estimé à environ 660 GHz d'après des mesures de Mössbauer sur le composé I de la peroxydase de Raifort<sup>8,21</sup>. Cette valeur est positive ce qui signifie que le niveau fondamental pour le fer est représenté par le nombre quantique  $m_s=0$ . L'interaction entre le radical et l'espèce oxoferryle résulte dans la formation de six niveaux d'énergie. Parce que les valeurs du couplage sont faibles comparées au paramètre  $D$ , les spectres RPE proviennent de façon prédominante de transitions entre les deux plus bas niveaux d'énergie qui résultent de l'interaction du niveau  $m_s=0$  du fer avec chacun des niveaux  $m_s = 1/2$  et  $m_s = -1/2$  du radical<sup>7</sup>.

On utilise la théorie des perturbations pour montrer que le spectre RPE d'un tel système couplé peut être décrit par un spectre de poudre avec des valeurs effectives de  $g$  qui dépendent des paramètres de l'interaction et du paramètre d'éclatement en champ nul de l'espèce hémique oxydée. L'Hamiltonien est séparé en deux parties, l'Hamiltonien non perturbé  $H^0$  et la perturbation  $H^p$ , comme suit :

$$\hat{H}^0 = \beta(g_X^{\text{Rad}} H_X \hat{S}_X^{\text{Rad}} + g_Y^{\text{Rad}} H_Y \hat{S}_Y^{\text{Rad}} + g_Z^{\text{Rad}} H_Z \hat{S}_Z^{\text{Rad}}) + \beta g_Z^{\text{Fe}} H_Z \hat{S}_Z^{\text{Fe}} + D \left( \hat{S}_Z^{\text{Fe}^2} - \frac{2}{3} \right) \quad (\text{Eq. 4.3})$$

$$\hat{H}^p = \beta(g_X^{\text{Fe}} H_X \hat{S}_X^{\text{Fe}} + g_Y^{\text{Fe}} H_Y \hat{S}_Y^{\text{Fe}}) + \Delta_X \hat{S}_X^{\text{Fe}} \hat{S}_X^{\text{Rad}} + \Delta_Y \hat{S}_Y^{\text{Fe}} \hat{S}_Y^{\text{Rad}} + \Delta_Z \hat{S}_Z^{\text{Fe}} \hat{S}_Z^{\text{Rad}} \quad (\text{Eq. 4.4})$$

On considère uniquement les deux niveaux d'énergie qui impliquent directement le sous-niveau  $m_S = 0$  du métal. Les fonctions propres de l'Hamiltonien non-perturbé sont notées  $\varphi_n$  et l'énergie correspondante  $E_n^{(0)}$ . Les corrections à l'énergie au premier et second ordre sont données par les équations suivantes :

$$E_n^{(1)} = \langle \varphi_n | H^p | \varphi_n \rangle \quad (\text{Eq. 4.5})$$

$$E_n^{(2)} = \sum_{p \neq n} \frac{|\langle \varphi_p | H^p | \varphi_n \rangle|^2}{E_n^{(0)} - E_p^{(0)}} \quad (\text{Eq. 4.6})$$

Lorsque le champ magnétique est appliqué suivant l'axe X, les Hamiltoniens  $H^0$  et  $H^p$  se réduisent à :

$$\hat{H}^0 = \beta g_X^{\text{Rad}} H_X \hat{S}_X^{\text{Rad}} + D \left( \hat{S}_Z^{\text{Fe}^2} - \frac{2}{3} \right) \quad (\text{Eq. 4.7})$$

$$\hat{H}^p = \beta g_X^{\text{Fe}} H_X \hat{S}_X^{\text{Fe}} + \Delta_X \hat{S}_X^{\text{Fe}} \hat{S}_X^{\text{Rad}} + \Delta_Y \hat{S}_Y^{\text{Fe}} \hat{S}_Y^{\text{Rad}} + \Delta_Z \hat{S}_Z^{\text{Fe}} \hat{S}_Z^{\text{Rad}} \quad (\text{Eq. 4.8})$$

Les fonctions propres, leur énergie correspondante et la correction au premier ordre en énergie sont données dans le tableau suivant :

$ \varphi_n\rangle$	$E^{(0)}$	$E^{(1)}$
$ \varphi_1\rangle =  0+\rangle$	$\frac{1}{2}\beta g_X^{\text{Rad}} H_X - \frac{2}{3}D$	0
$ \varphi_2\rangle =  0-\rangle$	$-\frac{1}{2}\beta g_X^{\text{Rad}} H_X - \frac{2}{3}D$	0
$ \varphi_3\rangle =  1+\rangle$	$\frac{1}{2}\beta g_X^{\text{Rad}} H_X + \frac{1}{3}D$	0
$ \varphi_4\rangle =  1-\rangle$	$-\frac{1}{2}\beta g_X^{\text{Rad}} H_X + \frac{1}{3}D$	0

$ \varphi_5\rangle =  -1 +\rangle$	$\frac{1}{2}\beta g_X^{\text{Rad}} H_X + \frac{1}{3}D$	0
$ \varphi_6\rangle =  -1 -\rangle$	$-\frac{1}{2}\beta g_X^{\text{Rad}} H_X + \frac{1}{3}D$	0

avec  $|+\rangle = \frac{|\alpha\rangle + |\beta\rangle}{\sqrt{2}}$  et  $|-\rangle = \frac{|\alpha\rangle - |\beta\rangle}{\sqrt{2}}$ .

La correction au deuxième ordre en énergie pour les niveaux  $|\varphi_1\rangle$  et  $|\varphi_2\rangle$  est obtenue en utilisant l'équation 6, ce qui aboutit à :

$$E_1^{(2)} = -\frac{1}{D} \left( \beta g_X^{\text{Fe}} H_X + \frac{\Delta_X}{2} \right)^2 + \frac{\Delta_Y^2}{4} \frac{1}{\beta g_X^{\text{Rad}} H_X - D} \quad (\text{Eq. 4.9})$$

$$E_2^{(2)} = -\frac{1}{D} \left( \beta g_X^{\text{Fe}} H_X - \frac{\Delta_X}{2} \right)^2 - \frac{\Delta_Y^2}{4} \frac{1}{\beta g_X^{\text{Rad}} H_X + D} \quad (\text{Eq. 4.10})$$

et il en résulte que :

$$h\nu = E_1 - E_2 = \beta g_X^{\text{Rad}} H_X - \frac{1}{D} (2\beta g_X^{\text{Fe}} H_X \Delta_X) + \frac{\Delta_Y^2}{2} \frac{\beta g_X^{\text{Rad}} H_X}{(\beta g_X^{\text{Rad}} H_X)^2 - D^2} \quad (\text{Eq. 4.11})$$

Dans le cas où l'effet Zeeman est négligeable devant le paramètre D d'éclatement en champ nul, l'expression se simplifie et on obtient :

$$g_X^{\text{eff}} = g_X^{\text{Rad}} - 2g_X^{\text{Fe}} \frac{\Delta_X}{D} - \frac{1}{2} g_X^{\text{Rad}} \frac{\Delta_Y^2}{D^2} \quad (\text{Eq. 4.12})$$

De la même manière, lorsque le champ magnétique est appliqué le long de l'axe Y, on obtient :

$$g_Y^{\text{eff}} = g_Y^{\text{Rad}} - 2g_Y^{\text{Fe}} \frac{\Delta_Y}{D} - \frac{1}{2} g_Y^{\text{Rad}} \frac{\Delta_X^2}{D^2} \quad (\text{Eq. 4.13})$$

Dans le cas où le champ magnétique est appliqué le long de l'axe Z, les Hamiltonien  $H^0$  et  $H^p$  se réduisent à :

$$\hat{H}^0 = \beta g_Z^{\text{Rad}} H_Z \hat{S}_Z^{\text{Rad}} + \beta g_Z^{\text{Fe}} H_Z \hat{S}_Z^{\text{Fe}} + D \left( \hat{S}_Z^{\text{Fe}^2} - \frac{2}{3} \right) \quad (\text{Eq. 4.14})$$

$$\hat{H}^p = \Delta_X \hat{S}_X^{\text{Fe}} \hat{S}_X^{\text{Rad}} + \Delta_Y \hat{S}_Y^{\text{Fe}} \hat{S}_Y^{\text{Rad}} + \Delta_Z \hat{S}_Z^{\text{Fe}} \hat{S}_Z^{\text{Rad}} \quad (\text{Eq. 4.15})$$

Les fonctions propres, leur énergie correspondante et la correction au premier ordre en énergie sont données dans le tableau suivant :

$ \varphi_n\rangle$	$E^{(0)}$	$E^{(1)}$
$ \varphi_1\rangle =  0 \alpha\rangle$	$\frac{1}{2}\beta g_Z^{\text{Rad}} H_Z - \frac{2}{3}D$	0
$ \varphi_2\rangle =  0 \beta\rangle$	$-\frac{1}{2}\beta g_Z^{\text{Rad}} H_Z - \frac{2}{3}D$	0
$ \varphi_3\rangle =  1 \alpha\rangle$	$\frac{1}{2}\beta g_Z^{\text{Rad}} H_Z + \beta g_Z^{\text{Fe}} H_Z + \frac{1}{3}D$	0
$ \varphi_4\rangle =  1 \beta\rangle$	$-\frac{1}{2}\beta g_Z^{\text{Rad}} H_Z + \beta g_Z^{\text{Fe}} H_Z + \frac{1}{3}D$	0
$ \varphi_5\rangle =  -1 \alpha\rangle$	$\frac{1}{2}\beta g_Z^{\text{Rad}} H_Z - \beta g_Z^{\text{Fe}} H_Z + \frac{1}{3}D$	0
$ \varphi_6\rangle =  -1 \beta\rangle$	$-\frac{1}{2}\beta g_Z^{\text{Rad}} H_Z - \beta g_Z^{\text{Fe}} H_Z + \frac{1}{3}D$	0

La correction au deuxième ordre en énergie pour les niveaux  $|\varphi_1\rangle$  et  $|\varphi_2\rangle$  est :

$$E_1^{(2)} = \frac{(\Delta_X + \Delta_Y)^2}{8} \frac{1}{\beta(g_Z^{\text{Rad}} - g_Z^{\text{Fe}})H_Z - D} + \frac{(\Delta_X - \Delta_Y)^2}{8} \frac{1}{\beta(g_Z^{\text{Rad}} + g_Z^{\text{Fe}})H_Z - D} \quad (\text{Eq. 4.16})$$

$$E_2^{(2)} = \frac{(\Delta_X + \Delta_Y)^2}{8} \frac{1}{-\beta(g_Z^{\text{Rad}} - g_Z^{\text{Fe}})H_Z - D} - \frac{(\Delta_X - \Delta_Y)^2}{8} \frac{1}{\beta(g_Z^{\text{Rad}} + g_Z^{\text{Fe}})H_Z + D} \quad (\text{Eq. 4.17})$$

on obtient donc :

$$h\nu = E_1 - E_2 = \beta g_Z^{\text{Rad}} H_Z - \frac{(\Delta_X - \Delta_Y)^2}{4} \frac{(g_Z^{\text{Rad}} + g_Z^{\text{Fe}})\beta H_Z}{[(g_Z^{\text{Rad}} + g_Z^{\text{Fe}})\beta H_Z]^2 - D^2} + \frac{(\Delta_X + \Delta_Y)^2}{4} \frac{(g_Z^{\text{Rad}} - g_Z^{\text{Fe}})\beta H_Z}{[(g_Z^{\text{Rad}} - g_Z^{\text{Fe}})\beta H_Z]^2 - D^2} \quad (\text{Eq. 4.18})$$

Dans le cas où l'effet Zeeman est négligeable devant le paramètre d'éclatement en champ nul, il en résulte que :

$$g_Z^{\text{eff}} = g_Z^{\text{Rad}} - (g_Z^{\text{Rad}} + g_Z^{\text{Fe}}) \left( \frac{\Delta_X - \Delta_Y}{2D} \right)^2 - (g_Z^{\text{Rad}} - g_Z^{\text{Fe}}) \left( \frac{\Delta_X + \Delta_Y}{2D} \right)^2 \quad (\text{Eq. 4.19})$$

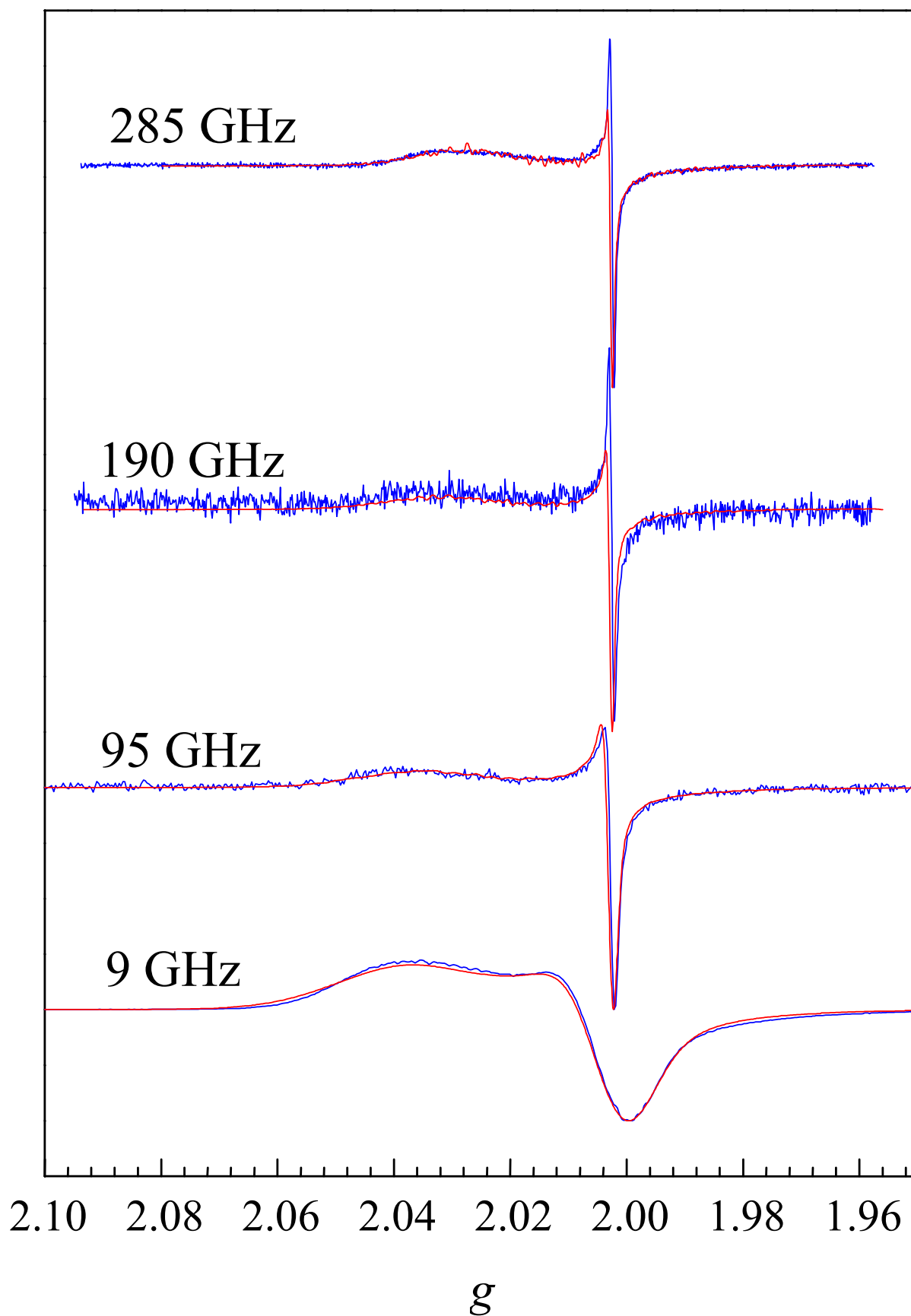
Les équations donnant les valeurs de  $g$  effectives montrent que les spectres RPE pour ce système sont indépendants du paramètre  $\Delta_Z$ . Même en effectuant le calcul complet pour les simulations numériques, les spectres calculés se sont révélés insensibles à la valeur de  $\Delta_Z$ ; il est donc impossible de déterminer la composante de l'interaction le long de la normale à l'hème et seules les composantes  $\Delta_X$  et  $\Delta_Y$  peuvent être déduites des spectres expérimentaux par simulation.

Une deuxième observation est que les valeurs effectives de  $g$  dépendent du rapport  $\Delta_i/D$  pondéré par les valeurs de  $g$  de l'espèce oxoferryle. Dans nos simulations, les valeurs de  $g$  du radical et de l'espèce oxoferryle ont été fixées et maintenues constantes aux valeurs rapportées dans la littérature. Les valeurs obtenues pour les constantes de couplages  $\Delta_X$  et  $\Delta_Y$  sont donc relatives à ces valeurs principales des tenseurs  $g$  pour les espèces en interaction. La disponibilité de plusieurs fréquences pour l'enregistrement des spectres RPE apporte un plus grand nombre de contraintes pour la simulation des spectres. En particulier, à 285 GHz les approximations faites pour la dérivation des expressions des valeurs effectives de  $g$  commencent à ne plus être mathématiquement valides. Le calcul complet effectué pour les simulations a permis de faire la discrimination entre plusieurs jeux de paramètres qui donnaient des simulations satisfaisantes des spectres expérimentaux enregistrés à basses fréquences. Finalement, afin de rendre compte de la largeur importante du signal à  $g_X^{\text{eff}}$  ainsi que de l'étendue du signal dans la partie champ fort (qui résulte de la largeur du pic à  $g_Y^{\text{eff}}$ ), il est nécessaire d'utiliser une distribution pour les paramètres de couplages  $\Delta_X$  et  $\Delta_Y$ . Ces distributions ont été modélisées par des fonctions gaussiennes centrées sur les valeurs  $\Delta_i$  et de mi-largeur à mi-hauteur  $\sigma_i$ .

#### IV. ETUDE DU COMPOSÉ I DU TYPE SAUVAGE DE LA CYTOCHROME c PEROXYDASE

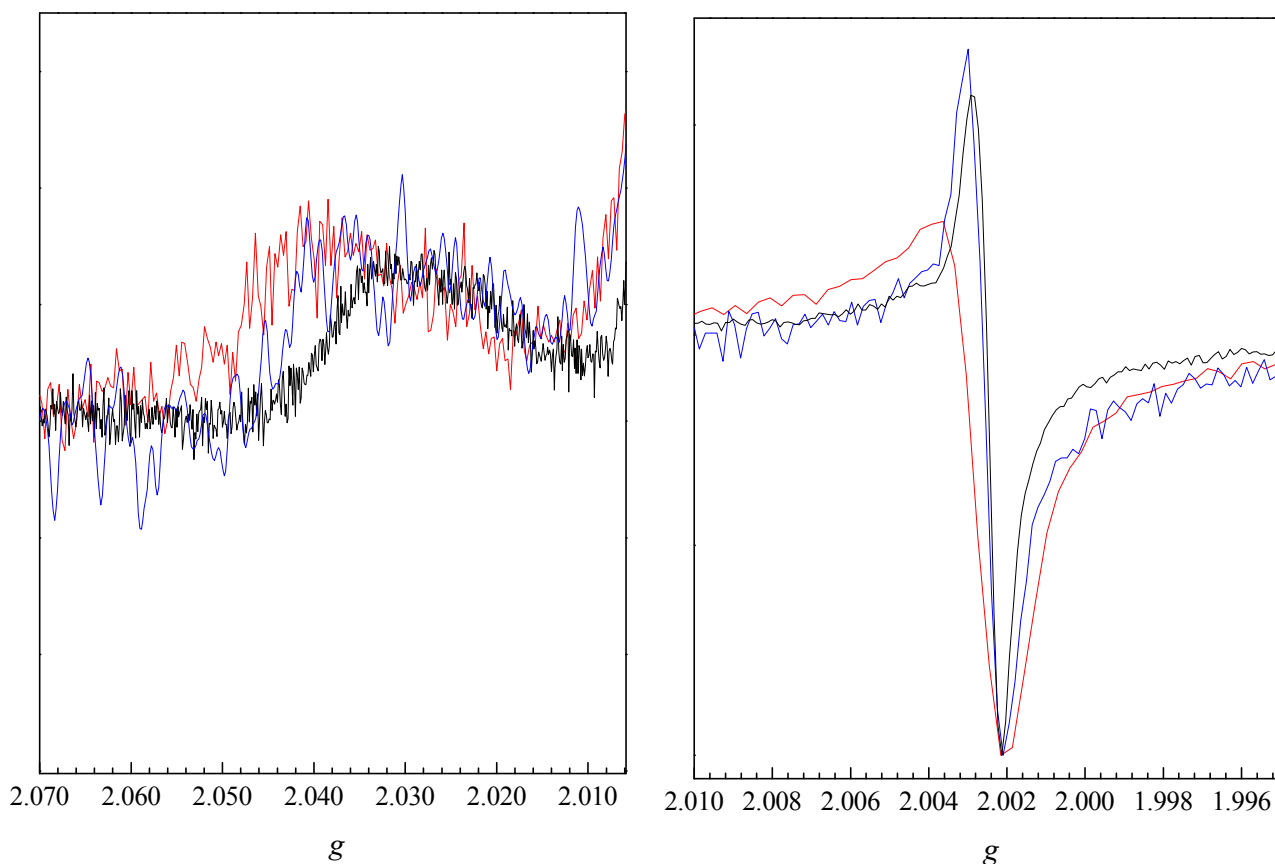
La figure 3 montre les spectres RPE obtenus à différentes fréquences (9.5, 95, 190 et 285 GHz) pour le composé I de la cytochrome c peroxydase obtenu par l'oxydation à deux électrons de l'hème Fe(III) haut spin de l'enzyme native avec le peroxyde d'hydrogène au bout d'un temps de réaction de 15s. Tous les spectres ont été enregistrés en utilisant le même échantillon. Ce composé I est constitué d'une espèce oxoferryle Fe(IV)=O, de spin  $S=1$ , en interaction faible avec un radical tryptophanyle,  $\text{Trp}_{191}^{\bullet+}$ , de spin  $S=1/2^{2,7}$ . Globalement, les différents spectres enregistrés coïncident en valeur de  $g$ . Cependant, des petits déplacements systématiques sont observés pour  $g_X^{\text{eff}}$  et  $g_Y^{\text{eff}}$  vers des valeurs plus faibles lorsque la fréquence augmente (voir figure 4). Le spectre large à 9.5 GHz a été expliqué par un tenseur  $g$  axial avec  $g_{\perp} = 2.01$  et  $g_{\parallel} = 2.04$ , résultant d'une distribution dans le couplage isotrope d'échange  $J$ . Nous avons étudié ce système plus en détails en utilisant la RPE à champ intense et des simulations numériques.

Les spectres simulés sont représentés sur la figure 3 avec les spectres expérimentaux. La composante de couplage la plus forte en amplitude est  $\Delta_X$  avec une valeur de  $-4.9$  GHz et une



**Figure 3.** Spectres RPE obtenus à différentes fréquences pour le composé I du type sauvage de la CcP. Les spectres expérimentaux sont représentés en bleu et les simulations en rouge. Les spectres ont été enregistrés à 4 K avec une amplitude de modulation de 2 mT.

distribution  $\sigma_i = 1.5$  GHz. Le signe négatif indique que le couplage entre le radical et l'espèce oxoferryle apparie les spins de façon parallèle le long de l'axe X. Pour  $\Delta_Y$ , la valeur obtenue est de  $-0.5$  GHz avec une distribution  $\sigma_i = 3.5$  GHz. Une distribution pour  $\Delta_Y$  plus importante que pour  $\Delta_X$  est nécessaire pour reproduire correctement la forme ainsi que les amplitudes relatives des différentes composantes du signal observé.



**Figure 4.** Zoom sur les portions des spectres RPE du composé I de la CcP correspondant à  $g_x^{eff}$  (à gauche) et  $g_y^{eff}$  (à droite) mettant en évidence un déplacement de la valeur effective du facteur  $g$  avec la fréquence. Conditions expérimentales identiques à celles données à la figure 3. Rouge : 95 GHz ; bleu : 190 GHz ; noir : 285 GHz.

La RPE à champ intense a été utilisée afin de mieux caractériser les paramètres décrivant l'interaction entre le radical tryptophanyle et l'espèce oxoferryle du composé I de la cytochrome c peroxydase. Contrairement à une étude précédente<sup>7</sup>, nous avons choisi d'utiliser un Hamiltonien d'interaction de spin généralisé représenté par un tenseur diagonal dont les axes principaux sont



colinéaires avec ceux des tenseurs  $g$ . Du fait de la résolution inhérente de cette technique en ce qui concerne l'anisotropie du tenseur  $g$ , il est important de développer rigoureusement les expressions obtenues par utilisation de la théorie des perturbations en fonction des différentes quantités  $g_i$  et  $\Delta_i$  (où  $i$  représente les composantes X, Y et Z ; voir équations 4.12, 4.13 et 4.19). Des calculs préliminaires ont été faits en utilisant les formules obtenues par la théorie des perturbations afin d'estimer les paramètres de couplage  $\Delta_X$  et  $\Delta_Y$ . Cependant, il est clair que les spectres expérimentaux de la figure 1 ne peuvent pas être caractérisés par un jeu unique de trois valeurs effectives de  $g$ . Le calcul complet de diagonalisation numérique de l'Hamiltonien donné par l'équation 4.2 a été utilisé pour simuler les spectres expérimentaux obtenus aux différentes fréquences. Le procédé de diagonalisation permet d'obtenir les valeurs propres et vecteurs propres de l'Hamiltonien. La condition de résonance est ensuite testée pour toutes les transitions possibles entre les niveaux d'énergies obtenus. Les résultats sont additionnés en tenant compte des probabilités de transition correspondantes. Le modèle d'interaction choisi permet de décrire correctement les spectres RPE obtenus pour le composé I de la CcP dans la gamme de fréquence 9-95 GHz. La distribution requise pour les valeurs  $\Delta_X$  et  $\Delta_Y$  pour simuler correctement les spectres est très certainement le reflet d'une distribution au niveau de la conformation de la protéine comme il a déjà été indiqué<sup>7</sup>.

La description de l'état magnétique du composé I par une faible interaction entre le radical tryptophanyle et l'espèce oxoferryle a été proposée initialement par Hoffman et collaborateurs<sup>7</sup>. Leur modèle permet de décrire correctement le signal RPE observé à 9 GHz et qui était décrit comme anormal dans les premières études. Cependant les valeurs des paramètres d'interaction diffèrent dans notre étude. Ceci est certainement dû à la modélisation différente envisagée pour décrire l'interaction. Hoffman et ses collaborateurs ont choisi de ne pas utiliser de tenseur pour décrire l'interaction mais plutôt une somme de terme d'échange isotrope  $-J \mathbf{S}_{Fe} \cdot \mathbf{S}_{Rad}$ <sup>7</sup>. Dans cette représentation, ils ont obtenu deux contributions d'échange: deux tiers de la population dans l'échantillon présente un couplage antiferromagnétique centré à  $-1.45$  GHz et avec une distribution de  $1.2$  GHz, et le tiers restant présente un couplage ferromagnétique centré à  $+2.9$  GHz et avec une distribution de  $0.6$  GHz. Les auteurs ont noté que les spectres RPE peuvent être reproduits de façon tout aussi satisfaisante soit en utilisant un tenseur pour décrire l'interaction soit un terme d'échange d'Heisenberg (interaction isotrope par définition) pour lequel le paramètre  $J$  est décrit par une somme de trois termes.

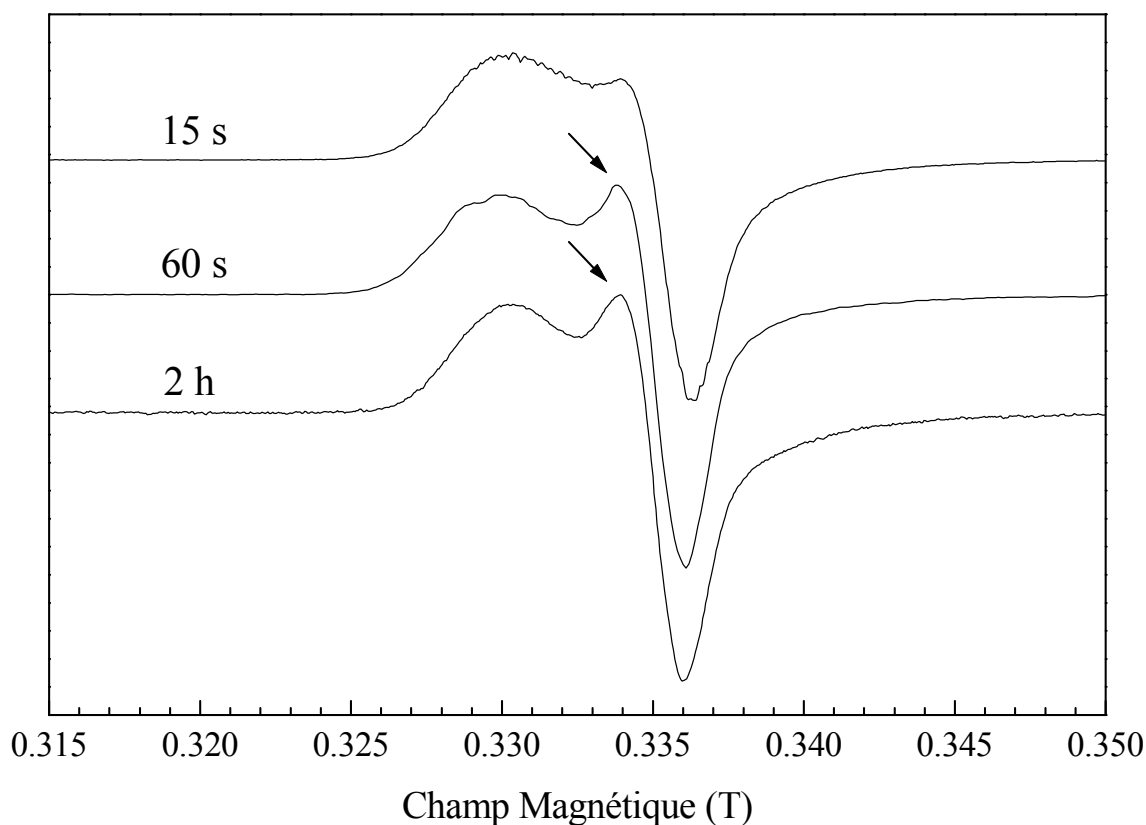
La différence fondamentale entre ces deux modèles est que la somme de termes d'échange est entièrement isotrope alors que l'utilisation d'un tenseur permet de rendre compte à la fois d'interactions isotropes et anisotropes (comme par exemple l'interaction dipolaire). Il est en principe possible d'extraire une contribution isotrope dans la représentation tensorielle en calculant la trace du tenseur. Cependant, dans le cas de l'interaction entre un spin 1 et un spin 1/2, la troisième composante diagonale du tenseur,  $\Delta_z$ , n'est pas accessible comme vu précédemment et il n'est donc pas possible de calculer la trace. La meilleure façon de distinguer entre isotropie et anisotropie au niveau de l'interaction est de regarder les données obtenues sur des monocristaux<sup>22</sup>. Le spectre RPE d'un échantillon monocristallin est constitué d'une seule ligne dans le cas où l'interaction est représentée par un tenseur, une orientation unique donnant lieu à une absorption unique. Au contraire, si l'interaction est une somme de contributions isotropes, le signal RPE sera constitué d'autant de lignes que de termes dans la somme, une orientation unique donnant lieu à un signal pour chaque couplage isotrope de la somme. Les données enregistrées pour des monocristaux du composé I de la CcP ne mettent en évidence qu'un seul signal et les mesures faites sur des échantillons polycristallins donnent essentiellement les mêmes résultats que ceux obtenus en solution gelée<sup>22</sup>. Ceci est entièrement compatible avec une interaction anisotrope et favorise la modélisation de l'interaction par un tenseur plutôt qu'une somme de termes d'échange purement isotrope.

En général, le modèle d'interaction anisotrope possède deux composantes: une composante isotrope due au couplage d'échange d'Heisenberg et une composante anisotrope provenant de l'interaction dipolaire entre les deux spins. Comme indiqué plus haut, il n'est pas possible dans ce cas de déterminer directement la partie isotrope (c'est-à-dire la trace) du tenseur d'interaction. Cependant, si on fait l'hypothèse d'une interaction dipolaire axiale (approximation point-dipôle), il est possible de calculer les composantes dipolaire  $\delta$  et d'échange  $J$  à partir de  $\Delta_x$  et  $\Delta_y$ . Des trois orientations possibles pour le vecteur dipôle-dipôle (suivant X, Y ou Z), seul le cas où le vecteur est orienté suivant l'axe X conduit à un résultat en accord avec les données. Dans cette approximation, le couplage d'échange obtenu est de -2.0 GHz, ce qui est comparable avec la valeur obtenue par Houseman pour la contribution antiferromagnétique. La valeur dipolaire, 1.5 GHz, conduit à une distance spin-spin de 3.3 Å, ce qui est en désaccord avec la structure cristallographique (distance de 7.1 Å entre le fer et l'azote du noyau indole du tryptophane). Cette différence est très certainement

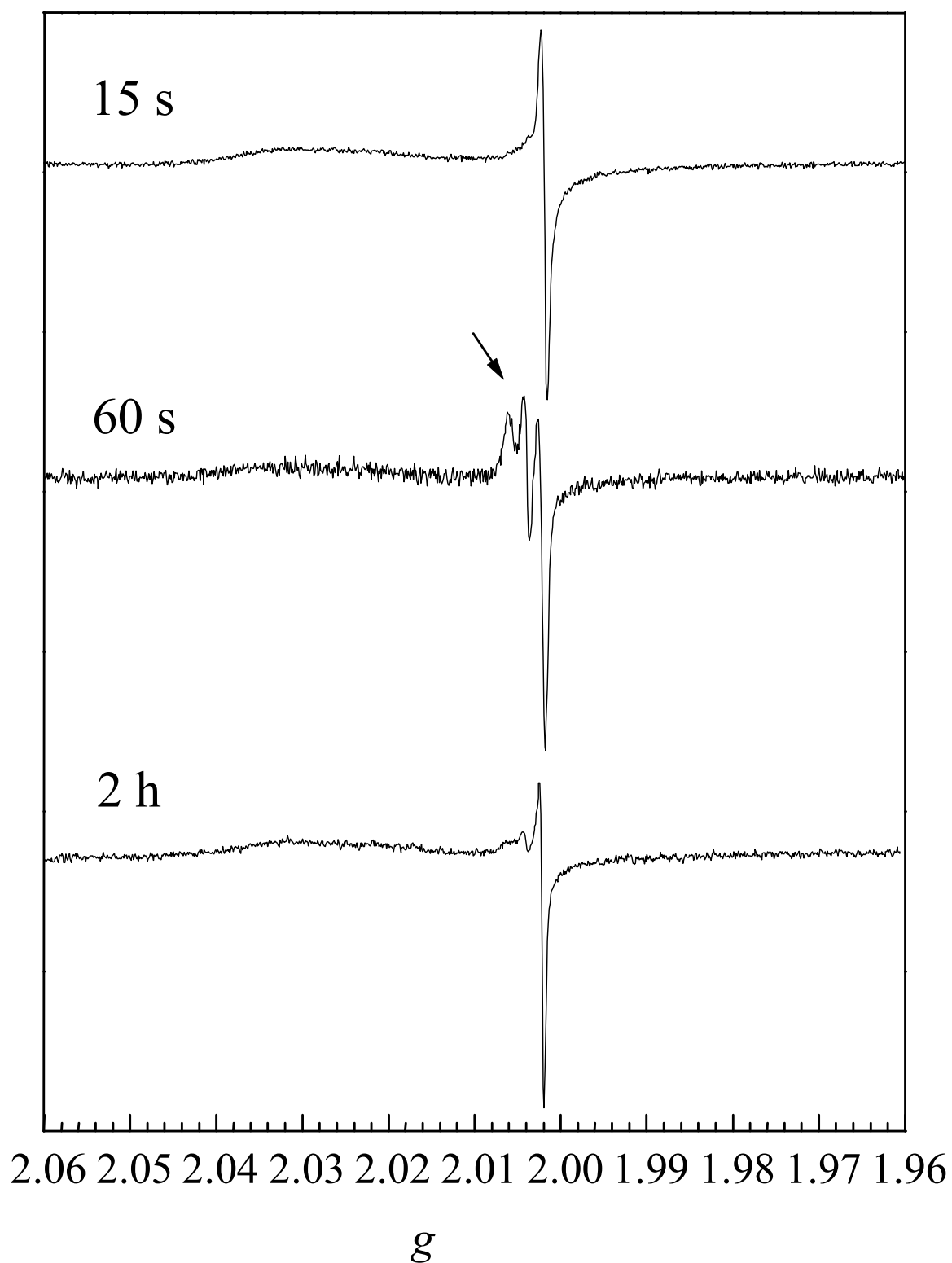
due à l'incapacité de l'approximation point-dipôle de calculer des distances fiables dans de tels cas plutôt qu'à l'hypothèse de colinéarité du vecteur dipolaire avec les axes du tenseur  $g$ .

## V. MISE EN EVIDENCE D'UN RADICAL TRANSITOIRE

Trois échantillons différents du composé I du type sauvage de la cytochrome c peroxydase ont été préparés en mélangeant, à 0 °C, l'enzyme avec un équivalent de peroxyde d'hydrogène pour des durées différentes, à savoir 15 s, 60 s et 2 h. Les spectres enregistrés à 9 GHz pour les trois échantillons ont confirmé que l'hème ferrique de l'enzyme native est complètement oxydé pour chacun des trois temps de mélange utilisés. La région autour de  $g=2$  des trois spectres montre le signal RPE axial dû au composé I (voir figure 5).



**Figure 5.** Spectres RPE à 9 GHz enregistrés pour le composé I du type sauvage de la CcP obtenus avec des temps différents de mélange de l'enzyme et du peroxyde d'hydrogène. Conditions expérimentales :  $\nu_{mw}=9.437$  GHz ; amplitude de modulation 0.5 mT ; puissance 2 mW ; température 4 K. La flèche indique la faible différence entre les spectres qui est attribuée à la formation d'une autre espèce.



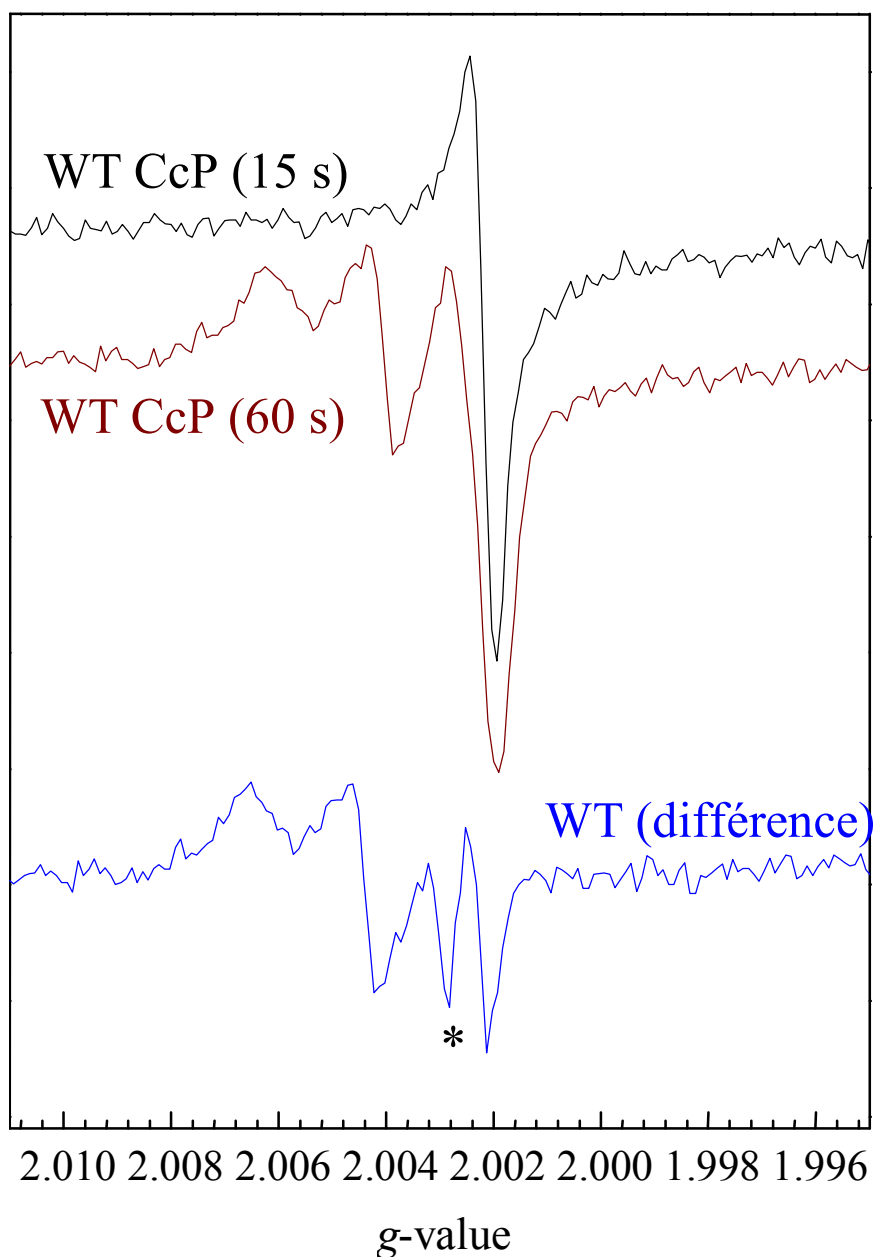
**Figure 6.** Spectres RPE à 285 GHz enregistrés pour le composé I du type sauvage de la CcP obtenus avec des temps différents de mélange de l'enzyme et du peroxyde d'hydrogène. Conditions expérimentales :  $\nu_{mw}=282.363$  GHz ; amplitude de modulation 2 mT ; fréquence de modulation 30 kHz ; température 4 K. La flèche indique la présence nette d'une autre espèce.

La seule différence notable dans les spectres à 9 GHz est la présence d'une intensité un peu plus forte au niveau de la partie étroite du signal (indiquée par une flèche sur la figure 5). L'origine de ce signal a été attribuée à un radical organique dont le spectre RPE se surimposerait sur le signal provenant du composé I. L'existence d'un tel radical a été un sujet controversé dans la littérature<sup>7,22-24</sup>.

La figure 6 montre les spectres RPE enregistrés à 285 GHz pour les mêmes échantillons. La comparaison des spectres pour les échantillons préparés avec des temps de mélange de 15s et 60s montre clairement qu'un nouveau signal RPE se surimpose au spectre du composé I lorsque le temps de mélange est augmenté. Il est intéressant de noter que ce signal décroît avec le temps et qu'il a pratiquement entièrement disparu au bout de deux heures d'incubation de l'échantillon à 0°C alors que le spectre du composé I est, lui, toujours présent et inchangé (pour le composé I,  $t_{1/2} = 6.6 \pm 1.4$  h).

Sur la figure 7, le spectre de différence obtenu en soustrayant les spectres RPE des échantillons correspondant aux temps de mélange de 15 et 60 s est représenté. Ce spectre correspond à celui de l'espèce intermédiaire formée. Le spectre de poudre obtenu présente des valeurs de g de 2.0064, 2.0044 et 2.0021. Le pic marqué d'un astérisque (à  $g=2.0028$ ) correspond à un artéfact de soustraction.

La présence d'un tel signal étroit en addition du signal du composé I dans le spectre RPE à 9 GHz dans le type sauvage de la CcP a été un sujet de controverse depuis sa première observation par Hori et Yonetani en 1985 dans une étude d'un monocristal par RPE à 3, 9 et 35 GHz<sup>22</sup>. D'après leurs résultats, les auteurs ont conclu que le signal étroit devait provenir de l'oxydation d'un résidu acide aminé de la protéine, différent de celui impliqué dans l'interaction d'échange avec l'hème. Il est à noter qu'à cette époque, la nature du composé I lui-même n'était pas parfaitement connue. D'autres auteurs ont également rapporté la présence d'une autre espèce radicalaire, indépendante du composé I et en plus faible concentration<sup>23-25</sup>. Par contre, des mesures de relaxation par RPE pulsée ne permirent pas d'obtenir des preuves de l'existence d'un tel radical dans les échantillons préparés par Houseman et ses collaborateurs<sup>7</sup>.

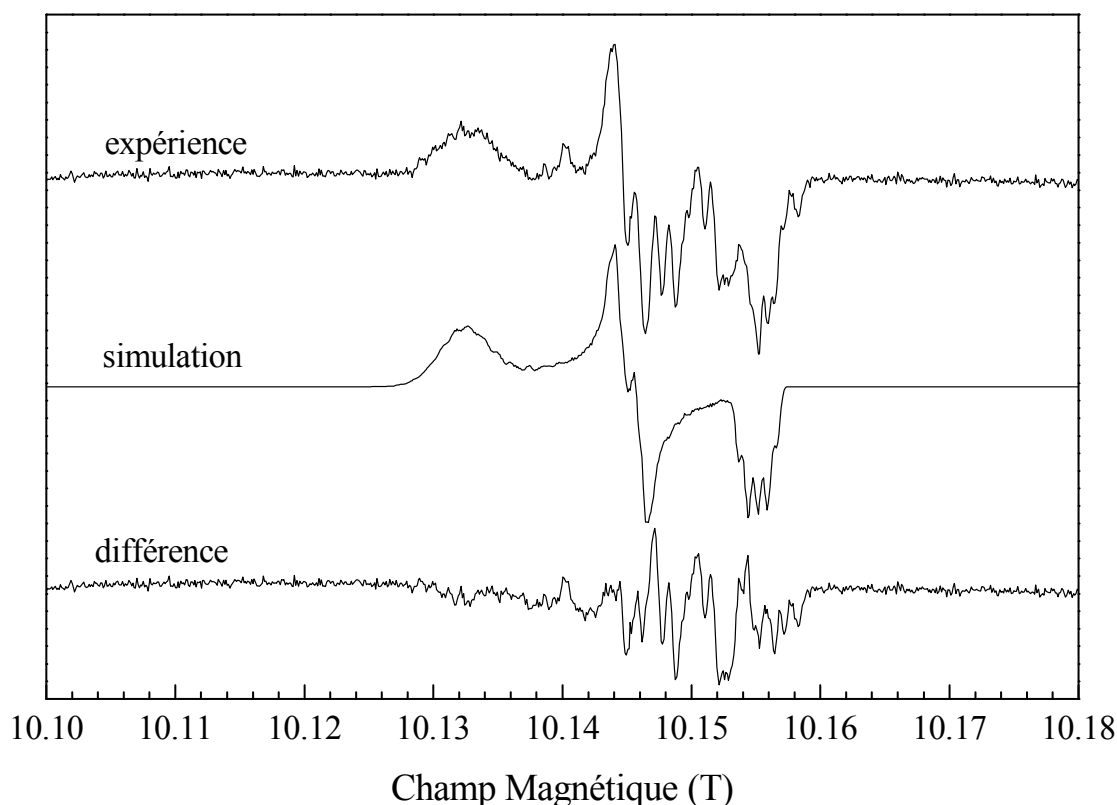


**Figure 7.** Expansion des spectres de la figure 5 pour mettre en évidence la formation d'un radical organique lorsque l'incubation de la CcP native avec le peroxyde d'hydrogène est prolongée de 15 à 60 s, à 0 °C. Le spectre de différence est représenté dans la partie inférieure du graphe. Le creux indiqué par l'astérisque est un artéfact de soustraction.

Dans toutes ces études, le temps de mélange utilisé pour préparer le composé I n'a jamais été mentionné explicitement par les auteurs, à l'exception de Fishel et collaborateurs (dans cette dernière étude, 1 à 1.5 équivalent de peroxyde d'hydrogène était utilisé pour préparer le composé I avec un temps de mélange de 1 minute)<sup>24</sup>. Hoffman et ses collaborateurs<sup>7</sup> ont interprété la présence d'un radical supplémentaire rapporté par Hori et Yonetani<sup>22</sup> ou Goodin et collaborateurs<sup>23</sup> comme le

résultat d'une oxydation trop poussée dans des échantillons mal préparés de composé I ou comme étant due à une fraction des enzymes dans lesquelles le radical tryptophanyle serait découplé de l'hème.

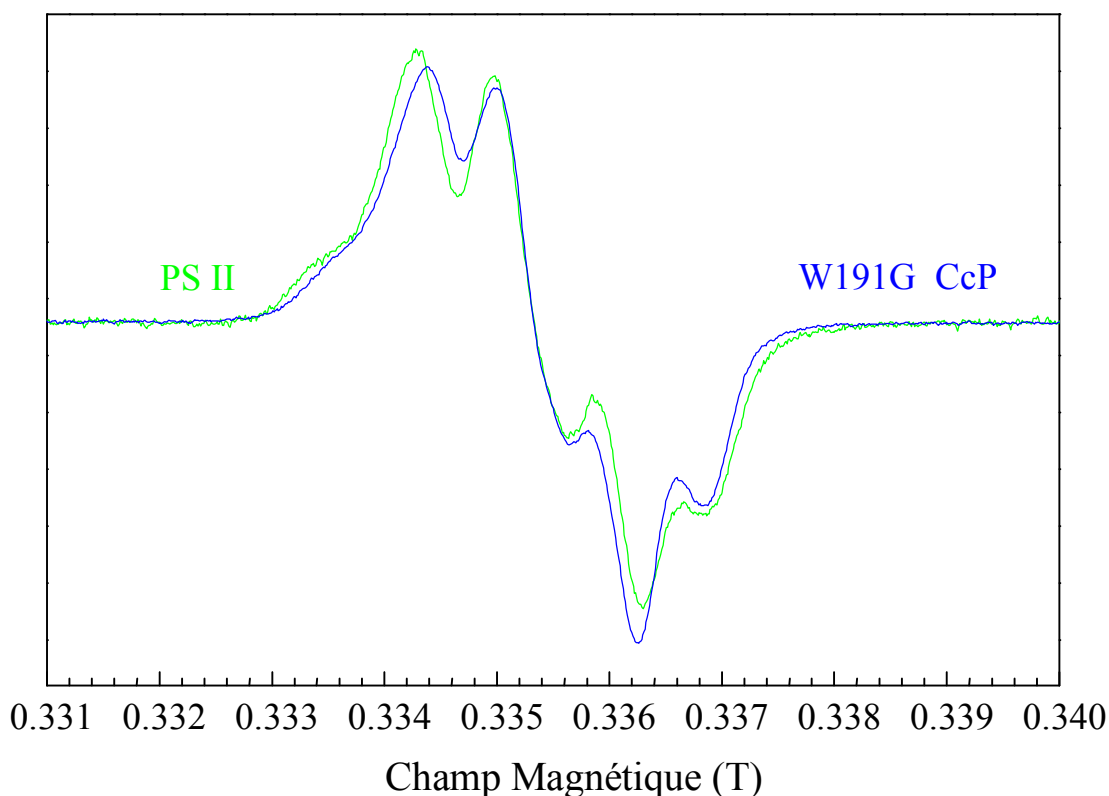
Nous avons enregistré les spectres RPE des échantillons de composé I obtenus pour des temps de mélange différents entre l'enzyme native et le peroxyde d'hydrogène. Les résultats montrent que le composé I est formé rapidement et qu'il est stable quand on incube les échantillons sur la glace pendant une heure. D'autre part, il est clair qu'un second radical se forme quand on incube le



**Figure 8.** Spectres expérimental et simulé du spectre RPE obtenu à 285 GHz pour le radical tyrosyle *in vitro* dans les cristaux de Tyr-HCl irradiés aux rayons  $\gamma$ . Le spectre expérimental a été enregistré à 10 K,  $\nu_{mw}=284.56$  GHz, amplitude de modulation 0.5 mT. Les cristaux ont été finement broyés et mis en suspension homogène dans du nujol pour éviter l'orientation des cristaux dans le champ magnétique intense appliqué. Une distribution de la valeur  $g_x$  a dû être utilisée pour reproduire la largeur du signal observée expérimentalement. Paramètres du spectre simulé :  $g_x=2.00658$ ,  $g_y=2.00404$ ,  $g_z=2.00208$  ( $\sigma_x=0.00032$ ), protons 3,5:  $a_x=25.2$  MHz,  $a_y=8.7$  MHz,  $a_z=18.2$  MHz; protons 2,6:  $a_{iso}=5$  MHz; proton  $\beta_1$ :  $a_x=39.2$  MHz,  $a_y=39.2$  MHz,  $a_z=39.2$  MHz; proton  $\beta_2$ :  $a_x=4.1$  MHz,  $a_y=15.7$  MHz,  $a_z=7.8$  MHz. Le spectre RPE montre qu'au moins un radical supplémentaire se forme au cours de l'irradiation. Le spectre RPE de ce(s) radical(aux) s'étend principalement entre les valeurs  $g_y$  et  $g_z$  du radical tyrosyle et apparaît dans le spectre de différence. Des temps d'exposition plus longs aux rayons  $\gamma$  conduisent à un accroissement de ces autres radicaux. Ceci a été rapporté dans des études semblables.

mélange sur la glace pour 1 minute et disparaît presque entièrement au bout d'une heure. La résolution accrue par l'utilisation de la RPE à champ intense a permis de distinguer clairement les deux espèces par leurs valeurs de  $g$ . Les valeurs de  $g$  obtenues pour le second radical formé sont en accord avec celles observées pour le radical tyrosyle *in vitro* dans les cristaux de tyrosine-HCl ( $g_x=2.00658$ ,  $g_y=2.00404$  et  $g_z=2.00208$ , voir figure 8). D'autre part, les données disponibles pour un radical tryptophanyle non couplé suggèrent une anisotropie plus faible ( $\Delta g = 0.0012$ ) que celle observée pour les radicaux tyrosyles ( $0.007 < \Delta g < 0.004$ ). Ainsi, il est proposé que ce radical soit un radical tyrosyle même s'il ne peut être totalement exclu qu'il s'agisse d'un autre radical qui, par un couplage faible à l'hème, présente des valeurs effectives de  $g$  similaires à celles d'un radical tyrosyle. Une hypothèse possible pour l'observation expérimentale de ce radical est qu'un résidu tyrosine soit oxydé par le composé I en tant que pseudo-substrat covalamment lié.

## VI. ETUDE DU COMPOSE I DANS LE MUTANT W191G DE LA CcP



**Figure 9.** Spectres RPE à 9 GHz du composé I obtenu dans le mutant W191G de la CcP. Le spectre de  $Y_D^\bullet$  du Photosystème II est représenté pour comparaison. Conditions expérimentales :  $\nu_{mw}=9.441$  GHz ; amplitude de modulation 0.06 mT (0.24 mT pour  $Y_D^\bullet$ ) ; power 0.05 mW (0.02 mW pour  $Y_D^\bullet$ ) ; T 70 K (10 K pour  $Y_D^\bullet$ ).

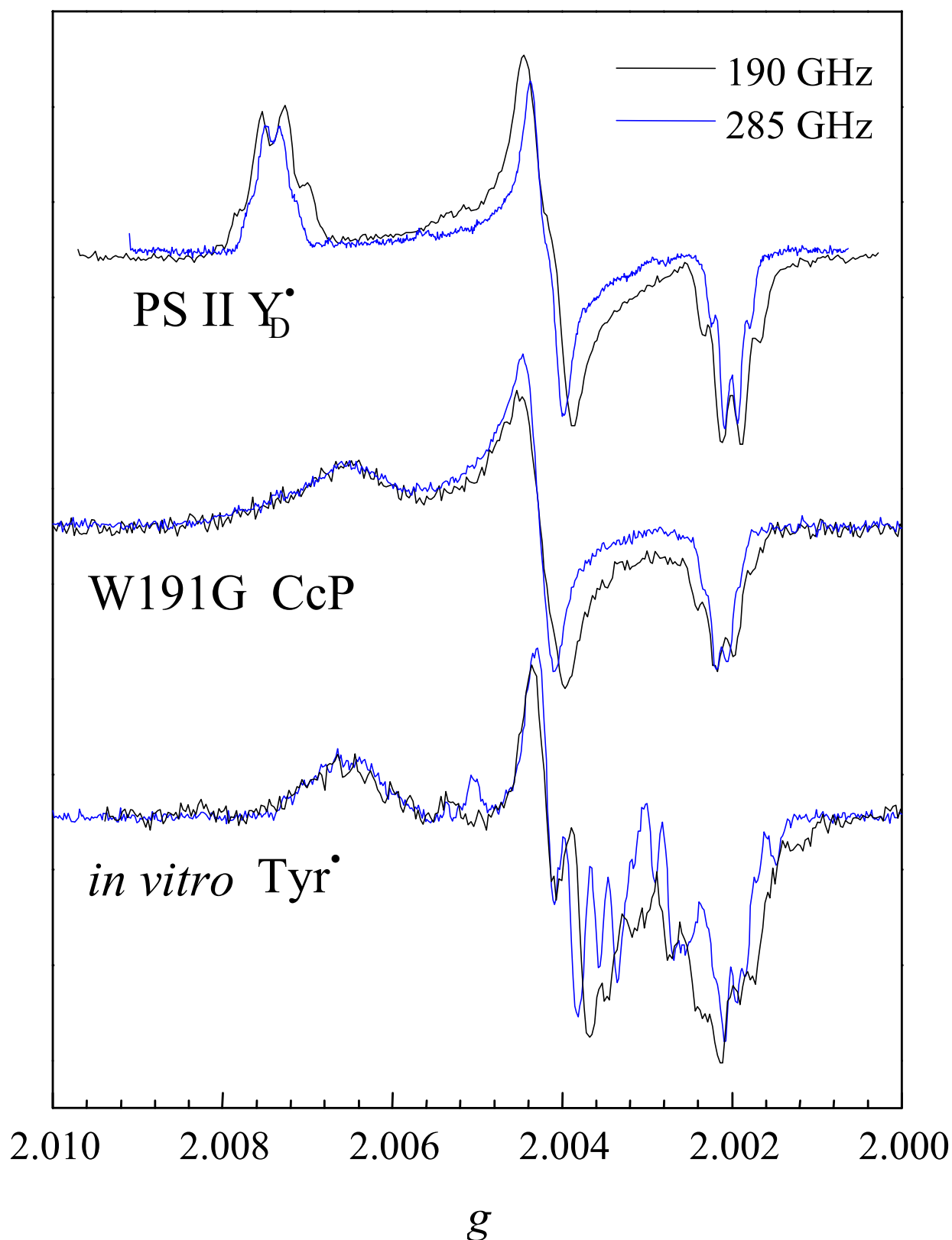


Le composé I du mutant W191G a été obtenu après réaction pendant 15 s de l'enzyme native avec le peroxyde d'hydrogène. Le spectre RPE obtenu à 9 GHz est représenté sur la figure 9 avec le spectre du radical tyrosyle  $Y_D^\bullet$  dans le photosystème II. Le signal du composé I pour le mutant W191G est centré à  $g_{iso} = 2.0040$  et couvre environ 5 mT en largeur. Le spectre étant pratiquement identique à celui du radical  $Y_D^\bullet$  du PS II, on peut légitimement supposer qu'il s'agit d'un radical tyrosyle avec des couplages hyperfins similaires à ceux déterminés pour  $Y_D^\bullet$ . Des études de saturation à 9 GHz sur le composé I du mutant W191G donne un  $P_{1/2}$  de 0.375 mW à 20 K, ce qui laisse supposer une interaction faible entre le radical et l'espèce oxoferryle.

La figure 10 (milieu) montre les spectres obtenus à 190 et 285 GHz pour le composé I du mutant W191G. L'enveloppe du signal est dominée cette fois par l'anisotropie Zeeman et le couplage hyperfin est résolu sur le signal à  $g_z$ . Le signal à  $g_x$  est large comparé au signal à  $g_x$  de  $Y_D^\bullet$  et cette largeur est la même pour les spectres à 190 et 285 GHz lorsqu'on utilise l'échelle en g ce qui indique qu'elle n'est pas due au couplage hyperfin comme c'est le cas pour  $Y_D^\bullet$ . Les simulations du spectre de poudre à 285 GHz donnent les valeurs principales 2.00660, 2.00420 et 2.00208 respectivement pour  $g_x$ ,  $g_y$  et  $g_z$  et les mêmes constantes de couplage hyperfin que pour  $Y_D^\bullet$  du PSII (voir chapitre II). De plus une distribution gaussienne de mi-largeur à mi-hauteur égale à 0.00055 en valeur de g a été nécessaire pour reproduire la partie large bas champ du spectre. Cette distribution montre que la composante large à  $g_x$  est due à une distribution électrostatique dans l'environnement du radical tyrosyle. Le spectre obtenu pour le composé I du mutant W191G est très similaire à celui obtenu pour le radical *in vitro* dans les cristaux irradiés de Tyr-HCl (figure 10, spectres du bas) du point de vue des valeurs de g et de l'environnement électrostatique. D'après les spectres obtenus, le radical obtenu dans le composé I du mutant W191G est attribué à un radical tyrosyle dans un environnement électrostatique similaire à celui du radical tyrosyle dans les cristaux de Tyr-HCl et avec des couplages hyperfins semblables à ceux de  $Y_D^\bullet$  du Photosystème II.

## VII. CONCLUSION

La RPE à champ intense a été utilisée ici pour étudier un système couplé dans le site actif d'une peroxydase et mettre clairement en évidence la formation d'un radical intermédiaire. Il est proposé que ce radical soit un radical tyrosyle. Le radical formé dans le composé I du mutant W191G a également été étudié et il apparaît également qu'il s'agit d'un radical tyrosyle. Les valeurs de g obtenues pour ces deux radicaux sont semblables, cependant les données disponibles pour le



**Figure 10.** Spectres RPE enregistrés à 285 GHz (bleu) et 190 GHz (noir) pour les radicaux  $Y_D^{\bullet}$  du Photosystème II (haut), du composé I du mutant W191G de la CcP (milieu) et les cristaux irradiés de Tyr-HCl (bas). Les spectres ont été enregistrés à 10 K (sauf CcP 20 K) et une amplitude de modulation de 0.5 mT (0.3 mT pour  $Y_D^{\bullet}$ ).

moment sont insuffisantes pour affirmer qu'il s'agit du même résidu tyrosine. Des expériences complémentaires seront nécessaires pour répondre à cette question.

## RÉFÉRENCES

- [1] DUNFORD, B. H. (1999) in *Heme Peroxidases*. John Willey & Sons, Inc., New York.
- [2] SIVARAJA, M., GOODIN, D. B., SMITH, M. & HOFFMAN, B. M. (1989) Identification by ENDOR of Trp191 as the free-radical site in cytochrome c peroxidase compound ES. *Science* **245**, 738-40.
- [3] HIRST, J., WILCOX, S. K., WILLIAMS, P. A., BLANKENSHIP, J., MCREE, D. E. & GOODIN, D. (2000) Submitted.
- [4] GOODIN, D. B. & MCREE, D. E. (1993) The Asp-His-Fe triad of cytochrome c peroxidase controls the reduction potential, electronic structure, and coupling of the tryptophan free radical to the heme. *Biochemistry* **32**, 3313-24.
- [5] FITZGERALD, M. M., CHURCHILL, M. J., MCREE, D. E. & GOODIN, D. B. (1994) Small molecule binding to an artificially created cavity at the active site of cytochrome c peroxidase. *Biochemistry* **33**, 3807-18.
- [6] MUSAH, R. A. & GOODIN, D. B. (1997) Introduction of novel substrate oxidation into cytochrome c peroxidase by cavity complementation: oxidation of 2-aminothiazole and covalent modification of the enzyme. *Biochemistry* **36**, 11665-74.
- [7] HOUSEMAN, A. L., DOAN, P. E., GOODIN, D. B. & HOFFMAN, B. M. (1993) Comprehensive explanation of the anomalous EPR spectra of wild-type and mutant cytochrome c peroxidase compound ES. *Biochemistry* **32**, 4430-43.
- [8] SCHULZ, C. E., DEVANEY, P. W., WINKLER, H., DEBRUNNER, P. G., DOAN, N., CHIANG, R., RUTTER, R. & HAGER, L. P. (1979) Horseradish peroxidase compound I: evidence for spin coupling between the heme iron and a 'free' radical. *FEBS Lett* **103**, 102-5.
- [9] BENECKY, M. J., FREW, J. E., SCOWEN, N., JONES, P. & HOFFMAN, B. M. (1993) EPR and ENDOR detection of compound I from *Micrococcus lysodeikticus* catalase. *Biochemistry* **32**, 11929-33.
- [10] IVANCICH, A., JOUVE, H. M. & GAILLARD, J. (1996) EPR evidence for a tyrosyl radical intermediate in bovine liver catalase. *Journal of the American Chemical Society* **118**, 12852-12853.
- [11] IVANCICH, A., JOUVE, H. M., SARTOR, B. & GAILLARD, J. (1997) EPR investigation of compound I in *Proteus mirabilis* and bovine liver catalases: formation of porphyrin and tyrosyl radical intermediates. *Biochemistry* **36**, 9356-64.
- [12] RUTTER, R., VALENTINE, M., HENDRICH, M. P., HAGER, L. P. & DEBRUNNER, P. G. (1983) Chemical nature of the porphyrin  $\pi$  cation radical in horseradish peroxidase compound I. *Biochemistry* **22**, 4769-74.
- [13] HUYETT, J. E., DOAN, P. E., GURBIEL, R., HOUSEMAN, A. L., SIVARAJA, M., GOODIN, D. B. & HOFFMAN, B. M. (1995) Compound ES of cytochrome c peroxidase contains a Trp  $\pi$ -cation

radical: characterization by cw and pulsed Q-band ENDOR spectroscopy. *J Am Chem Soc* **117**, 9033-9041.

- [14] KHINDARIA, A. & AUST, S. D. (1996) EPR detection and characterization of lignin peroxidase porphyrin  $\pi$ -cation radical. *Biochemistry* **35**, 13107-11.
- [15] BONAGURA, C. A., SUNDARAMOORTHY, M., PAPP, H. S., PATTERSON, W. R. & POULOS, T. L. (1996) An engineered cation site in cytochrome c peroxidase alters the reactivity of the redox active tryptophan. *Biochemistry* **35**, 6107-15.
- [16] SHIMOKAWA, T., KULMACZ, R. J., DEWITT, D. L. & SMITH, W. L. (1990) Tyrosine 385 of prostaglandin endoperoxide synthase is required for cyclooxygenase catalysis. *J Biol Chem* **265**, 20073-6.
- [17] TSAI, A., HSI, L. C., KULMACZ, R. J., PALMER, G. & SMITH, W. L. (1994) Characterization of the tyrosyl radicals in ovine prostaglandin H synthase-1 by isotope replacement and site-directed mutagenesis. *J Biol Chem* **269**, 5085-91.
- [18] SHI, W., HOGANSON, C. W., ESPE, M., BENDER, C. J., BABCOCK, G. T., PALMER, G., KULMACZ, R. J. & TSAI, A. (2000) Electron paramagnetic resonance and electron nuclear double resonance spectroscopic identification and characterization of the tyrosyl radicals in prostaglandin H synthase 1. *Biochemistry* **39**, 4112-21.
- [19] HOFFMAN, B. M., ROBERTS, J. E., KANG, C. H. & MARGOLIASH, E. (1981) Electron paramagnetic and electron nuclear double resonance of the hydrogen peroxide compound of cytochrome c peroxidase. *J Biol Chem* **256**, 6556-64.
- [20] LENDZIAN, F. (2000). Personal Communication.
- [21] SCHULZ, C. E., RUTTER, R., SAGE, J. T., DEBRUNNER, P. G. & HAGER, L. P. (1984) Mossbauer and electron paramagnetic resonance studies of horseradish peroxidase and its catalytic intermediates. *Biochemistry* **23**, 4743-54.
- [22] HORI, H. & YONETANI, T. (1985) Powder and single-crystal electron paramagnetic resonance studies of yeast cytochrome c peroxidase and its peroxide and its peroxide compound, Compound ES. *J Biol Chem* **260**, 349-55.
- [23] GOODIN, D. B., MAUK, A. G. & SMITH, M. (1987) The peroxide complex of yeast cytochrome c peroxidase contains two distinct radical species, neither of which resides at methionine 172 or tryptophan 51. *J Biol Chem* **262**, 7719-24.
- [24] FISHEL, L. A., FARNUM, M. F., MAURO, J. M., MILLER, M. A., KRAUT, J., LIU, Y. J., TAN, X. L. & SCHOLES, C. P. (1991) Compound I radical in site-directed mutants of cytochrome c peroxidase as probed by electron paramagnetic resonance and electron-nuclear double resonance. *Biochemistry* **30**, 1986-96.
- [25] SCHOLES, C. P., LIU, Y. J., FISHEL, L. A., FARNUM, M. F., MAURO, J. M. & KRAUT, J. (1989) Recent ENDOR and pulsed electron paramagnetic resonance studies of cytochrome c peroxidase-compound I and its site-directed mutants. *Isr. J. Chem.* **29**, 85-92.

# CHAPITRE V



## ETUDE DU COMPOSE I DE LA PROSTAGLANDINE H SYNTHASE

---

## CHAPITRE V :

### ETUDE DU COMPOSE I DE LA PROSTAGLANDINE H SYNTHASE.

---

#### I. INTRODUCTION : LA PROSTAGLANDINE SYNTHASE

La prostaglandine endoperoxyde H synthase (PGHS) est une enzyme membranaire qui existe sous deux isoformes, PGHS-1 et PGHS-2. Elle intervient dans les premières étapes de la biosynthèse des prostaglandines et thromboxanes à partir de l'acide arachidonique<sup>1-3</sup>. Elle catalyse la conversion de l'acide arachidonique (AA) en prostaglandine G<sub>2</sub> (PGG<sub>2</sub>) ainsi que la réduction à deux électrons de PGG<sub>2</sub> en prostaglandine PGH<sub>2</sub>. Chacune des deux isoformes de l'enzyme possède deux activités catalytiques distinctes : cyclooxygénase et peroxydase. Les sites actifs pour chacune de ces deux activités sont physiquement distincts au sein de la protéine<sup>4,5</sup>. Cependant, l'activité cyclooxygénase est liée à l'activité peroxydase du point de vue mécanistique<sup>3,6</sup>. Dans le cycle peroxydase, représenté sur le schéma 1, l'état natif de l'enzyme réagit avec un peroxyde pour

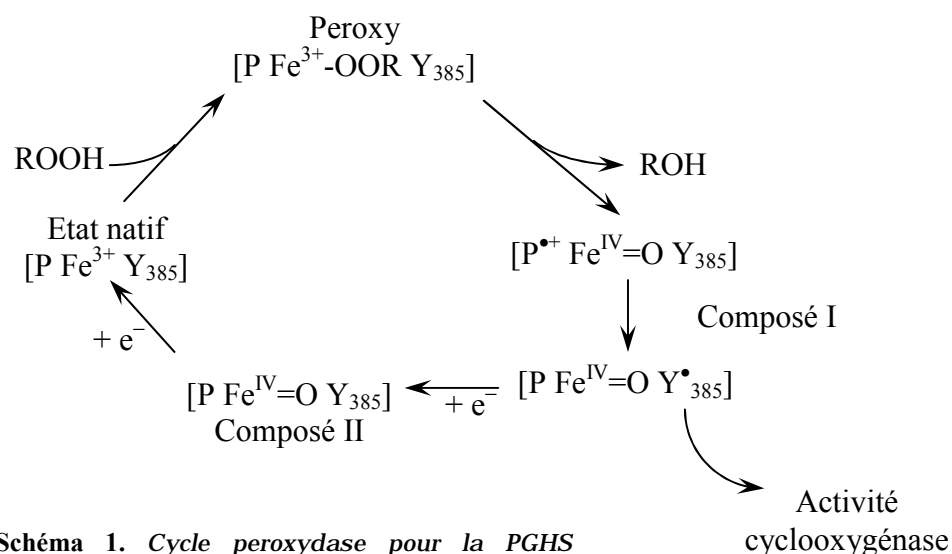
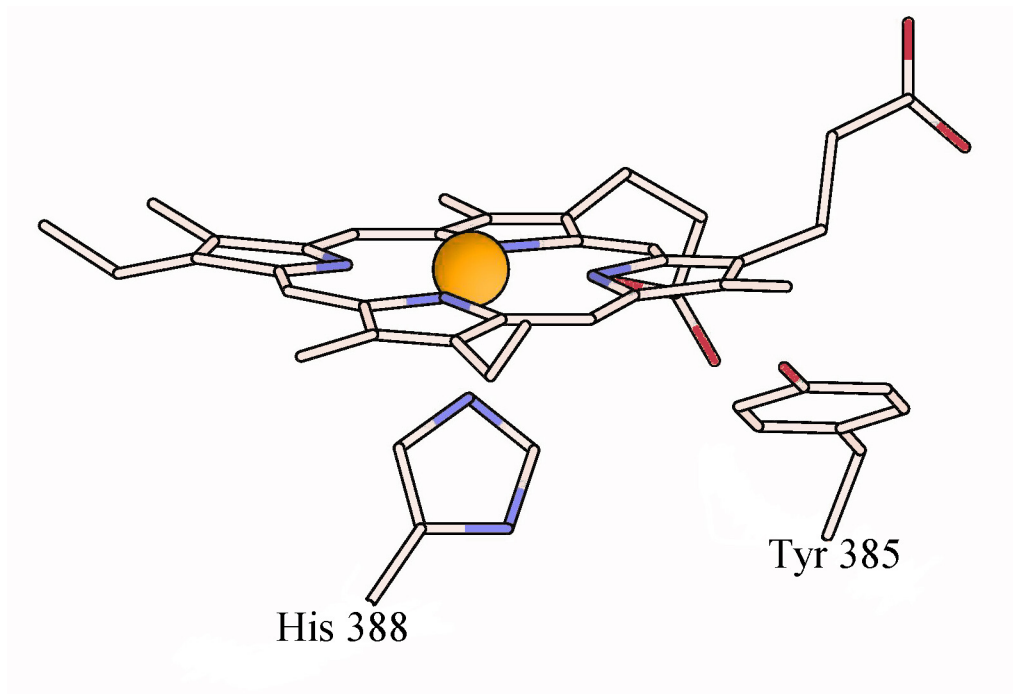


Schéma 1. Cycle peroxydase pour la PGHS  
(adapté de la référence 17)

former un état peroxydé qui conduit ensuite à la formation du composé I. Ce composé est formé initialement d'une espèce oxoferryle avec un radical cation porphyrinique<sup>6-8</sup> mais, de la même manière que pour la cytochrome c peroxydase, le radical cation porphyrinique est réduit par un résidu acide aminé aromatique qui, dans le cas de la PGHS, a été identifié au résidu Tyr385 par des expériences de mutagenèse dirigée<sup>9,10</sup>. On obtient donc l'état  $\text{PFe}^{\text{IV}}=\text{O Tyr}^\bullet$ . Ce radical tyrosyle est responsable de l'abstraction de l'hydrogène pro S du carbone 13 de l'acide arachidonique qui constitue l'étape d'initiation du cycle cyclooxygénase. L'oxydation préalable de l'hème au site peroxydase qui conduit à la formation du composé I est donc nécessaire pour la réaction cyclooxygénase. Par contre, l'activité peroxydase peut exister indépendamment de l'activité cyclooxygénase<sup>11,12</sup>. Le site actif pour la peroxydase est représentée sur la figure 1<sup>13</sup>.



**Figure 1.** Structure du site actif de la prostaglandine H synthase. Cette figure a été réalisée à partir du code PDB 1CQE (voir référence 13).

Dans l'étude de la réaction de la PGHS 1 avec des peroxydes, et en particulier l'hydroperoxyde d'éthyle, plusieurs signaux RPE de radicaux ont été rapportés. Si la réaction est arrêtée par congélation rapide dans l'azote liquide après addition d'hydroperoxyde à l'enzyme native, on peut observer un signal RPE qui a la forme d'un doublet dont la largeur est d'environ 3.5 mT<sup>7,14</sup>. Lorsque l'échantillon présentant ce doublet est incubé sur la glace, on observe une rapide évolution du signal doublet en un signal singulet d'approximativement même largeur qui est stable pour

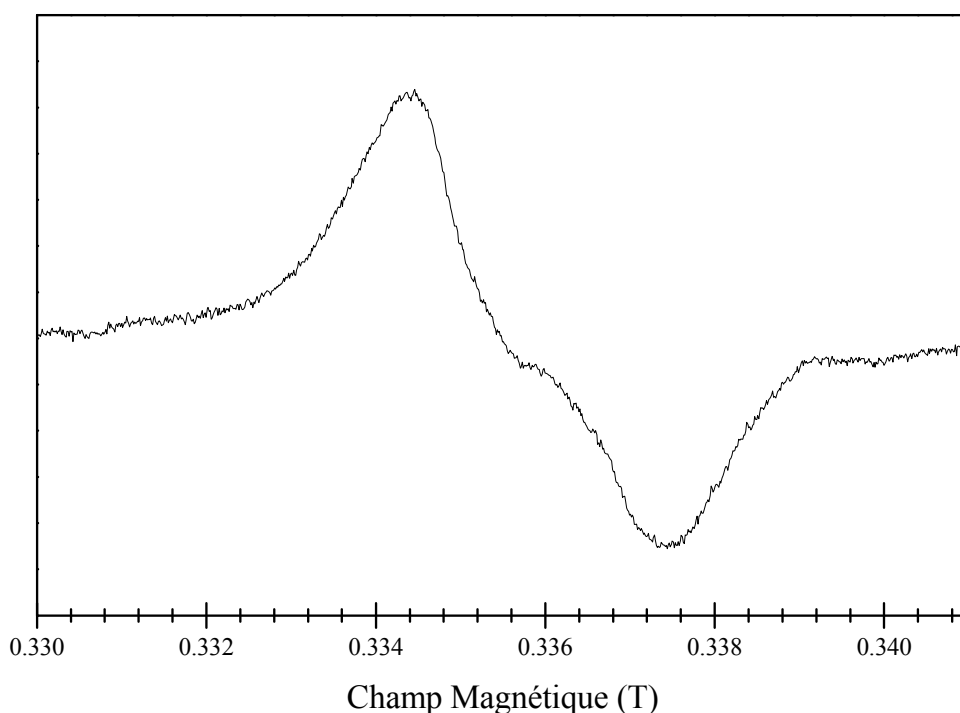


plusieurs minutes à 0 °C. Lorsque l'incubation est prolongée pour des temps plus longs (quelques heures), ce singulet, appelé singulet large, évolue vers un singulet de largeur nettement plus faible (environ 2.5 mT) que l'on appelle singulet étroit et qui est obtenu par autoinactivation de l'enzyme<sup>15</sup>. Un singulet un peu plus étroit est également obtenu directement lorsqu'on ajoute un hydroperoxyde à l'enzyme inactivée par incubation préalable avec un inhibiteur de cyclooxygénase, par exemple l'indométhacine<sup>16</sup>. La largeur du singulet est de 2.2 mT dans ce cas. Il a été démontré, en utilisant le marquage isotopique, que tous ces signaux proviennent de radicaux tyrosyles<sup>9</sup>.

Une étude détaillée par RPE et ENDOR des signaux obtenus par réaction de l'enzyme avec l'hydroperoxyde d'éthyle (doublet large, singulet large, singulet étroit et singulet dans l'enzyme inhibée) a été publiée récemment<sup>17</sup>. En particulier, cette étude montre que le doublet large et le singulet étroit obtenu par auto-inactivation correspondent à deux états distincts alors que le singulet large est un mélange de ces deux états. D'autre part, dans le cas du radical tyrosyle catalytiquement actif responsable du signal doublet large aucune preuve de liaison hydrogène n'a été trouvée. Enfin, le signal obtenu par réaction du peroxyde avec l'enzyme inhibée par incubation avec l'indométhacine a été attribué à un résidu tyrosine différent de Y385. Les informations fournies par la RPE à champ intense sont tout à fait appropriées à l'étude d'un tel système. Au travers de la mesure des valeurs de *g* on peut espérer obtenir des informations sur les radicaux mis en jeu, pouvoir les distinguer et étudier leur environnement direct. Une collaboration a été établie avec le Professeur Jerry Babcock et son équipe à l'Université d'Etat du Michigan pour obtenir des échantillons du composé I de la PGHS dans les divers états radicalaires. Ce chapitre présente les résultats préliminaires de cette étude commencée en fin de thèse et qui est un projet en cours.

## II. ETUDE DU DOUBLET LARGE

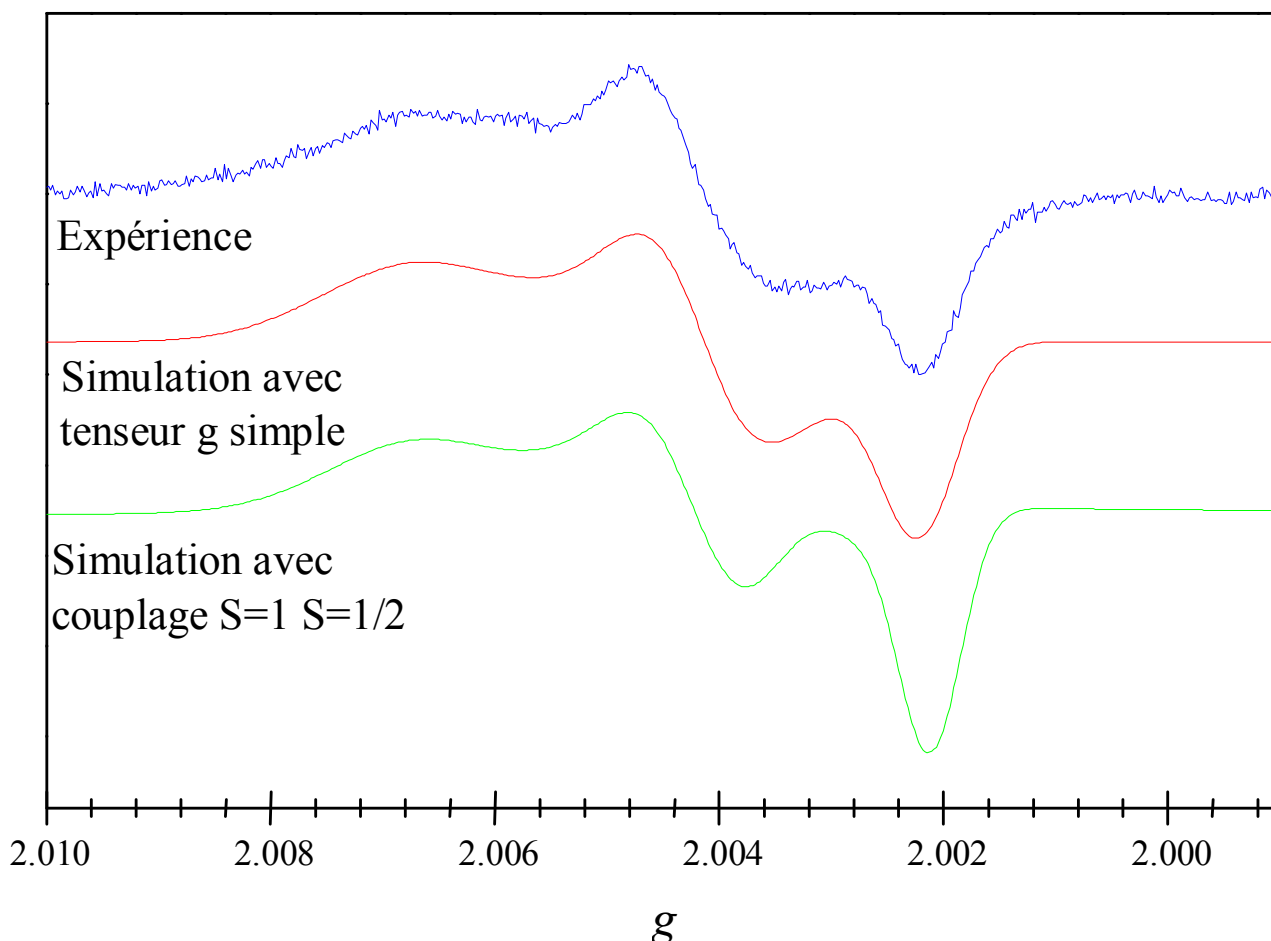
La figure 2 montre le spectre enregistré à 9 GHz sur le composé I de la PGHS obtenu par réaction pendant 2s avec l'hydroperoxyde d'éthyle. On observe le doublet large conventionnellement obtenu pour des temps très courts de réaction entre l'enzyme native et le peroxyde. Ce spectre rappelle celui obtenu pour le radical tyrosyle dans la ribonucléotide réductase et peut être simulé avec des paramètres similaires pour les valeurs de *g* et les couplages hyperfins<sup>17</sup>. Le spectre à 285 GHz a été enregistré sur le même échantillon que celui utilisé pour enregistrer le spectre à 9 GHz. Il est représenté sur la figure 3. La première observation est que la largeur de raie



**Figure 2.** Spectre enregistré à 9 GHz pour un échantillon de PGHS congelé rapidement après réaction pendant 2s avec le peroxyde d'éthyle.

est importante. La largeur du signal à  $g_z$  peut-être expliqué par les couplages hyperfins dont la contribution est importante.

Cependant les signaux à  $g_x$  et  $g_y$  présentent une largeur plus importante, ce qui peut être le signe d'un couplage faible contribuant à l'élargissement inhomogène des raies. Le signal à  $g_x$  est lui-même très large, ce qui peut également provenir d'un environnement électrostatique très distribué (voir chapitre VI). La seconde observation concerne les valeurs de  $g$  elles-mêmes ; les valeurs mesurées sur le spectre sont : 2.0062 (centre du signal large), 2.0041 et 2.0022. Le spectre peut être simulé de façon satisfaisante avec un spectre de poudre (voir figure 3). La valeur de  $g_x$  obtenue est faible et suggère une liaison hydrogène relativement forte. Si l'on examine en détail la structure cristallographique pour le résidu tyrosine 385, on s'aperçoit qu'il y a à proximité un autre résidu tyrosine (distance oxygène-oxygène entre les deux résidus 2.78 Å) ainsi qu'une molécule d'eau (distance oxygène-oxygène 2.80 Å); de ce point de vue, on peut donc s'attendre à ce que le résidu Tyr385 soit lié par liaison hydrogène. Cependant aucun signe d'une telle liaison n'a été décelé par ENDOR. La question dans ce cas est de savoir si l'on peut rationaliser un radical tyrosyle sans liaison hydrogène avec de telles valeurs de  $g$ .



**Figure 3.** Spectre RPE obtenu à 285 GHz pour le doublet large. Le spectre expérimental est en bleu. Rouge: simulation avec tenseur  $g$  simple  $g_x=2.00693$  (distribution 0.0007)  $g_y=2.00413$  (distribution 0.0003)  $g_z=2.00219$ . Vert: simulation avec le modèle de deux spins couplés  $S=1$   $S=1/2$  (chapitre IV)  $g_x^{\text{Tyr}}=2.0088$ ,  $g_y^{\text{Tyr}}=2.0045$ ,  $g_z^{\text{Tyr}}=2.0021$ ,  $\Delta_x=0.4$  GHz (distribution 0.15 GHz)  $\Delta_y=0.05$  GHz (distribution 0.08 GHz).

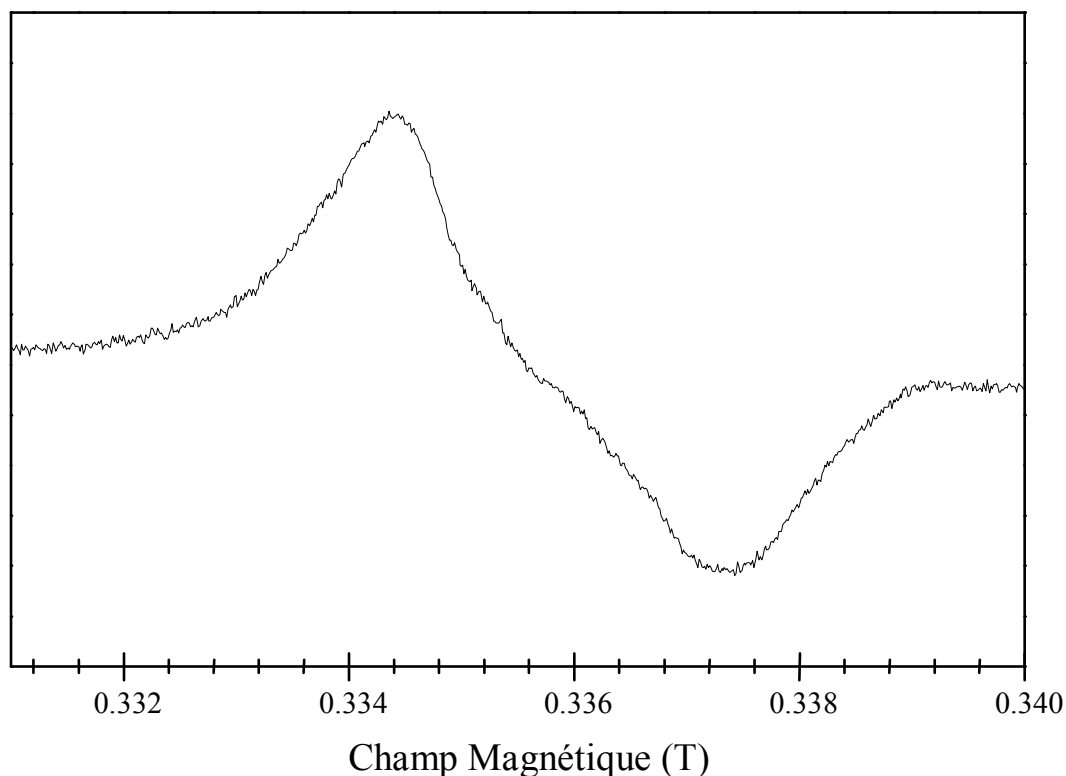
D'après l'étude faite sur le composé I de la cytochrome c peroxydase (voir chapitre précédent), un couplage du radical avec l'espèce oxoferryle de spin  $S=1$  conduit en première approximation à un spectre RPE semblable à un spectre de poudre avec des valeurs de  $g$  effectives qui dépendent des valeurs de  $g$  du radical et de l'espèce oxoferryle isolés ainsi que des valeurs de couplage et du paramètre d'éclatement en champ nul pour le fer. Si l'on fait intervenir ce modèle dans le cas du composé I de la PGHS il est possible, partant des valeurs de  $g$  d'un radical isolé comme celles utilisées dans les simulations des spectres à 9 GHz<sup>17</sup>, d'obtenir les valeurs de  $g$  mesurées expérimentalement en faisant intervenir un couplage très faible entre l'hème et le radical. Une simulation dans ce cas de figure est également représentée sur la figure 3.

L'expérience de RPE faite ne permet pas, *a priori*, de distinguer clairement entre les deux modèles et d'apporter une réponse définitive à la question de liaison hydrogène. De nouvelles expériences de RPE à champ intense sont nécessaires pour vérifier les résultats et l'apport d'autres techniques (Raman, ESEEM) devrait aider dans l'analyse de ce problème.

### III. ETUDE DU SINGULET LARGE

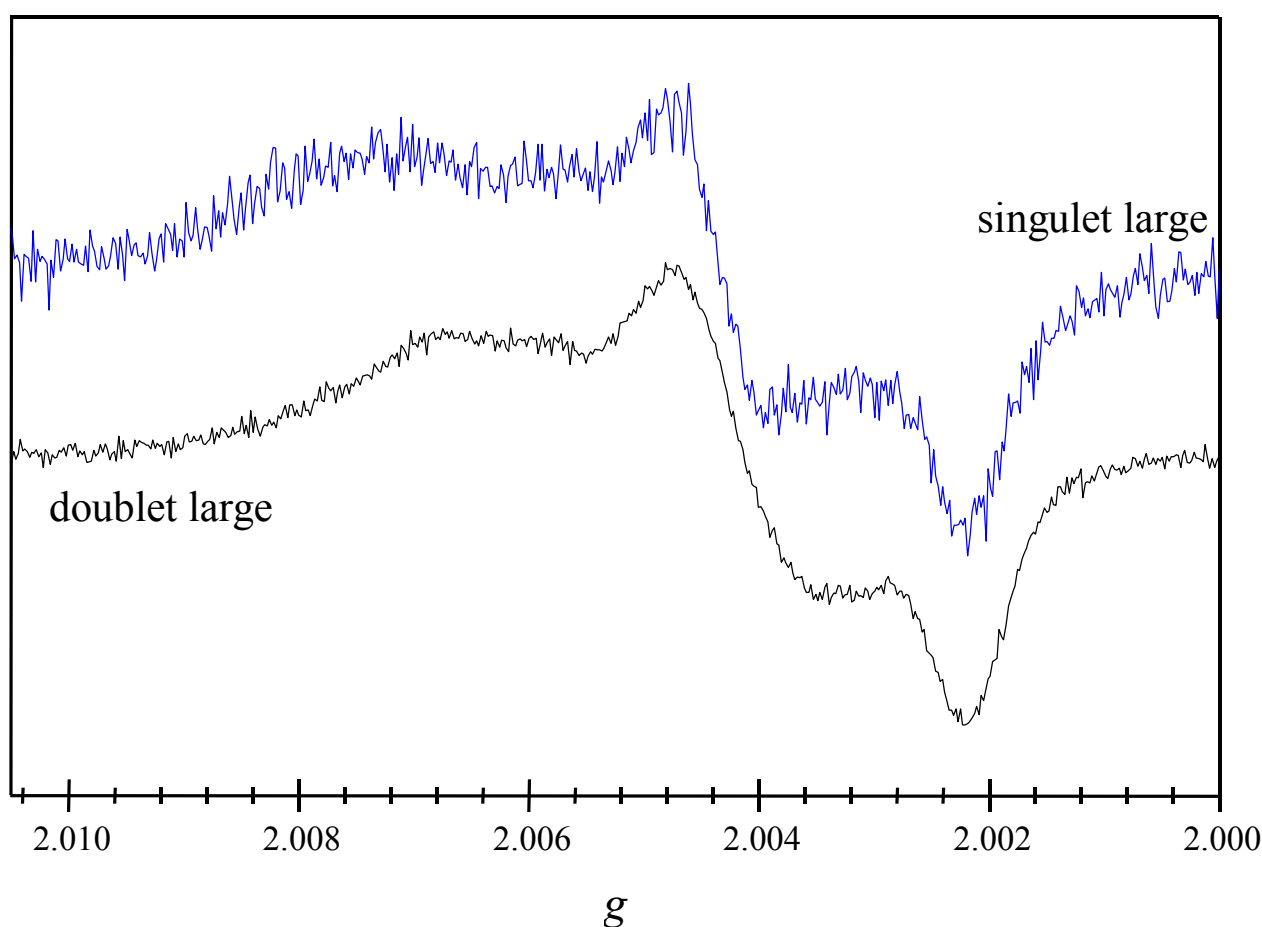
Après l'étude du doublet large, l'échantillon a été incubé sur la glace pour obtenir le singulet large. La transformation s'accompagne d'une perte d'intensité au niveau du signal, les spectres obtenus à champ intense ont un signal sur bruit moins bon et il n'a pas été possible pour l'instant de poursuivre l'étude pour le singulet étroit obtenu par autoinactivation.

Le spectre obtenu à 9 GHz est représenté sur la figure 4. Deux interprétations ont été données dans la littérature pour ce spectre. Kulmacz et collaborateurs<sup>16</sup> ainsi que Tsai et collaborateurs<sup>18</sup> ont conclu que les trois types de signaux (doublet large, singulet large et singulet étroit) provenaient de trois radicaux distincts. Au contraire, De Gray et collaborateurs<sup>15</sup> ont montré, à l'aide de simulations numériques, que l'on pouvait reproduire le spectre du singulet large en combinant les spectres du doublet large et du singulet étroit; ainsi, le singulet large ne représente pas un radical distinct mais un mélange contenant deux populations de radicaux. L'étude de Shi et collaborateurs par ENDOR<sup>17</sup> a permis de montrer que le singulet large était bien un mélange du doublet large et du singulet étroit et non une espèce distincte.



**Figure 4.** Spectre enregistré à 9 GHz après incubation pendant 1 minute à 0°C de l'échantillon contenant le doublet large.

Le spectre obtenu à 285 GHz pour le singulet large est représenté sur la figure 5. Le signal à  $g_x$  est plus large que dans le cas du doublet large. Il couvre à la fois la zone occupée par le signal à  $g_x$  du doublet large et une portion supplémentaire à plus bas champ. Puisque le singulet large est un mélange du doublet large et du singulet étroit, il en résulte que la valeur  $g_x$  du singulet étroit est plus haute que celle du doublet large. En considérant que le doublet large et le singulet étroit proviennent du même résidu tyrosine (Tyr385) cela implique qu'une perturbation de ce site se produit au cours de l'autoinactivation de l'enzyme (cassure d'une liaison hydrogène par exemple, découplage de l'hème, ...). Il est également possible que le site du radical responsable du singulet étroit soit distinct de Tyr385, c'est-à-dire qu'il y ait migration du radical au cours de l'autoinactivation.



**Figure 5.** Spectre enregistré à 285 GHz pour le singulet large obtenu après incubation du doublet large dont le spectre est représenté dessous pour comparaison.

#### IV. CONCLUSION

La RPE à champ intense peut apporter des éléments de réponse concernant l'étude des radicaux intervenant dans la réaction de la PGHS avec l'hydroperoxyde d'éthyle. Les résultats préliminaires obtenus ont besoin d'être reproduits, si possible avec un signal plus intense pour obtenir une meilleure résolution et pouvoir accéder au singulet étroit. D'autre part, l'étude du radical dans l'enzyme inhibée par inactivation avec l'indométhacine est prévue pour pouvoir comparer les spectres obtenus à 285 GHz pour les différentes espèces. Une approche multifréquence devrait également permettre de distinguer, au niveau des largeurs de raie importantes observées, les contributions des couplages (hyperfins, spin électronique-spin électronique, ...) des contributions dues à une distribution des valeurs de  $g$  (en particulier pour  $g_x$ ).

## RÉFÉRENCES

- [1] SMITH, W. L., ELING, T. E., KULMACZ, R. J., MARNETT, L. J. & TSAI, A. (1992) Tyrosyl radicals and their role in hydroperoxide-dependent activation and inactivation of prostaglandin endoperoxide synthase. *Biochemistry* **31**, 3-7.
- [2] SMITH, W. L., GARAVITO, R. M. & DEWITT, D. L. (1996) Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. *J Biol Chem* **271**, 33157-60.
- [3] SMITH, W. L., DEWITT, D. L. & GARAVITO, R. M. (2000) Cyclooxygenases: Structural, Cellular, and Molecular Biology. *Annu Rev Biochem* **69**, 145-182.
- [4] KURUMBAIL, R. G., STEVENS, A. M., GIERSE, J. K., McDONALD, J. J., STEGEMAN, R. A., PAK, J. Y., GILDEHAUS, D., MIYASHIRO, J. M., PENNING, T. D., SEIBERT, K., ISAKSON, P. C. & STALLINGS, W. C. (1996) Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents [published erratum appears in Nature 1997 Feb 6;385(6616):555]. *Nature* **384**, 644-8.
- [5] LUONG, C., MILLER, A., BARNETT, J., CHOW, J., RAMESHA, C. & BROWNER, M. F. (1996) Flexibility of the NSAID binding site in the structure of human cyclooxygenase-2. *Nat Struct Biol* **3**, 927-33.
- [6] TSAI, A., WU, G., PALMER, G., BAMBAL, B., KOEHN, J. A., MARSHALL, P. J. & KULMACZ, R. J. (1999) Rapid kinetics of tyrosyl radical formation and heme redox state changes in prostaglandin H synthase-1 and -2. *J Biol Chem* **274**, 21695-700.
- [7] KARTHEIN, R., DIETZ, R., NASTAINCZYK, W. & RUF, H. H. (1988) Higher oxidation states of prostaglandin H synthase. EPR study of a transient tyrosyl radical in the enzyme during the peroxidase reaction. *Eur J Biochem* **171**, 313-20.
- [8] DIETZ, R., NASTAINCZYK, W. & RUF, H. H. (1988) Higher oxidation states of prostaglandin H synthase. Rapid electronic spectroscopy detected two spectral intermediates during the peroxidase reaction with prostaglandin G2. *Eur J Biochem* **171**, 321-8.
- [9] TSAI, A., HSI, L. C., KULMACZ, R. J., PALMER, G. & SMITH, W. L. (1994) Characterization of the tyrosyl radicals in ovine prostaglandin H synthase-1 by isotope replacement and site-directed mutagenesis. *J Biol Chem* **269**, 5085-91.
- [10] SHIMOKAWA, T., KULMACZ, R. J., DEWITT, D. L. & SMITH, W. L. (1990) Tyrosine 385 of prostaglandin endoperoxide synthase is required for cyclooxygenase catalysis. *J Biol Chem* **265**, 20073-6.
- [11] KOSHKIN, V. & DUNFORD, H. B. (1999) Coupling of the peroxidase and cyclooxygenase reactions of prostaglandin H synthase. *Biochim Biophys Acta* **1430**, 341-8.
- [12] MIZUNO, K., YAMAMOTO, S. & LANDS, W. E. (1982) Effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on fatty acid cyclooxygenase and prostaglandin hydroperoxidase activities. *Prostaglandins* **23**, 743-57.

- [13] SEIBOLD, S. A., CERDA, J. F., MULICHAK, A. M., SONG, I., GARAVITO, R. M., ARAKAWA, T., SMITH, W. L. & BABCOCK, G. T. (2000) Peroxidase activity in prostaglandin endoperoxide H synthase-1 occurs with a neutral histidine proximal heme ligand. *Biochemistry* **39**, 6616-24.
- [14] KULMACZ, R. J., TSAI, A. L. & PALMER, G. (1987) Heme spin states and peroxide-induced radical species in prostaglandin H synthase. *J Biol Chem* **262**, 10524-31.
- [15] DEGRAY, J. A., LASSMANN, G., CURTIS, J. F., KENNEDY, T. A., MARNETT, L. J., ELING, T. E. & MASON, R. P. (1992) Spectral analysis of the protein-derived tyrosyl radicals from prostaglandin H synthase. *J Biol Chem* **267**, 23583-8.
- [16] KULMACZ, R. J., REN, Y., TSAI, A. L. & PALMER, G. (1990) Prostaglandin H synthase: spectroscopic studies of the interaction with hydroperoxides and with indomethacin. *Biochemistry* **29**, 8760-71.
- [17] SHI, W., HOGANSON, C. W., ESPE, M., BENDER, C. J., BABCOCK, G. T., PALMER, G., KULMACZ, R. J. & TSAI, A. (2000) Electron paramagnetic resonance and electron nuclear double resonance spectroscopic identification and characterization of the tyrosyl radicals in prostaglandin H synthase 1. *Biochemistry* **39**, 4112-21.
- [18] TSAI, A. L., PALMER, G. & KULMACZ, R. J. (1992) Prostaglandin H synthase. Kinetics of tyrosyl radical formation and of cyclooxygenase catalysis. *J Biol Chem* **267**, 17753-9.



# CHAPITRE VI



## LES VALEURS DE $g$ COMME SONDES DE L'ENVIRONNEMENT D'UN RADICAL

---

## CHAPITRE VI :

### LES VALEURS DE $g$ COMME SONDE DE L'ENVIRONNEMENT D'UN RADICAL

---

#### I. INTRODUCTION

Les valeurs de  $g$  des radicaux dépendent de la structure électronique de ces radicaux. Ainsi, elles peuvent servir de sonde pour les identifier et étudier les interactions avec leur environnement. La question est de savoir quelle est la sensibilité des valeurs de  $g$  à l'environnement protéique. Dans des études expérimentales publiées, il a été montré que, dans le cas des radicaux tyrosyles, la valeur  $g_x$  (et dans une moindre mesure  $g_y$ ) est très sensible à l'environnement électrostatique du radical, et en particulier de l'oxygène phénolique. L'anisotropie du facteur  $g$  pour le radical tyrosyle de la ribonucléotide réductase (RNR)<sup>1</sup> est très différente de celle du radical stable  $Y_D^\bullet$  du photosystème II<sup>1,2</sup> ou du radical  $Y^\bullet$  de la catalase de foie de bœuf<sup>3,4</sup>. De même, les valeurs de  $g$  du radical tyrosyle de la RNR varient d'une espèce à l'autre ou pour des mutants d'un même organisme à cause de différences au niveau des liaisons hydrogène<sup>1,5</sup>. Des effets semblables ont été mis en évidence sur des modèles de quinone *in vitro*<sup>6</sup>.

Dans ce chapitre on se propose d'étudier les effets de changements au niveau de liaisons hydrogène qui sont des cas particuliers d'interaction électrostatique. Cette étude porte sur le photosystème II. Des observations faites sur  $Y_D^\bullet$  et  $Y_Z^\bullet$  ainsi que  $Q_A^{\bullet-}$  sont rapportées. Une étude plus poussée est faite pour le radical anion de la phéophytine. Cette dernière étude a trouvé son origine dans les résultats obtenus au chapitre II pour l'orientation du radical anion phéophytine, en particulier, l'orientation du tenseur  $g$  par rapport à la molécule qui a été proposée alors.

## II. THEORIE

Dans le cas des radicaux tyrosyles et des semiquinones, la valeur  $g_x$  peut-être obtenue approximativement au moyen de la relation suivante :

$$\Delta g_x = g_x - g_e = \frac{2\zeta_O \rho_z \rho_y^*}{\Delta E_{n\pi^*}} \quad (\text{Eq. 6.1})$$

où  $\zeta_O$  est la constante de couplage spin-orbite pour l'oxygène,  $\rho_z$  est la densité de spin sur l'oxygène pour l'état fondamental et  $\rho_y^*$  est la contribution de l'orbitale  $p_y$  de l'oxygène à l'état correspondant à l'excitation d'un électron de l'orbitale moléculaire non-liante sur l'oxygène vers l'orbitale moléculaire simplement occupée (SOMO, singly occupied molecular orbital), l'énergie d'excitation correspondante étant  $\Delta E_{n\pi^*}$ <sup>7-9</sup>. L'effet perturbatif de l'environnement électrostatique peut être inclus en ajoutant un terme d'énergie potentielle,  $\phi(r)$ , au dénominateur de l'expression donnée par l'équation 6.1, et un facteur multiplicatif,  $k(r)$ , au numérateur pour tenir compte de modifications dans les densités de spin à cause de charges extérieures<sup>6</sup>. On obtient ainsi :

$$\Delta g_x = g_x - g_e \approx \frac{2\zeta_O \rho_z \rho_y^* k(r)}{\Delta E_{n\pi^*} + \phi(r)} = \frac{2\zeta_O \rho_z \rho_y^* k(r)}{\Delta E_{n\pi^*}} \left(1 + \frac{C}{r^2} + \frac{D}{r^3} + \frac{E}{r^6} + \dots\right) \quad (\text{Eq. 6.2})$$

Dans le cas d'interactions électrostatiques moyennes à faibles (cas des liaisons hydrogène en particulier), l'effet principal pour les radicaux tyrosyles et les semiquinones est un changement dans l'énergie des électrons non-liants et le facteur  $k(r)$  est proche de l'unité. Pour un effet électrostatique globalement positif, C et D sont des grandeurs négatives et E est négligeable. On obtient donc dans ce cas une diminution de la valeur  $g_x$ . L'anisotropie du facteur  $g$  ( $g_x - g_z$ ) diminue lorsque l'on passe d'un radical tyrosyle isolé (par exemple  $Y^\bullet$  de la RNR) à un radical avec une liaison hydrogène forte (radical  $Y^\bullet$  in vitro dans les cristaux irradiés de tyrosine HCl). Théoriquement, la valeur  $g_y$  est également affectée par un effet électrostatique :

$$\Delta g_y = g_y - g_e \approx \frac{2\zeta_O \rho_z \rho_x^* k(r)}{\Delta E_{n\pi^*} + \phi(r)} \quad (\text{Eq. 6.3})$$

où  $\rho_x^*$  est cette fois la contribution de l'orbitale  $p_x$  de l'oxygène à l'état correspondant à l'excitation d'un électron de l'orbitale moléculaire non-liante sur l'oxygène vers l'orbitale moléculaire

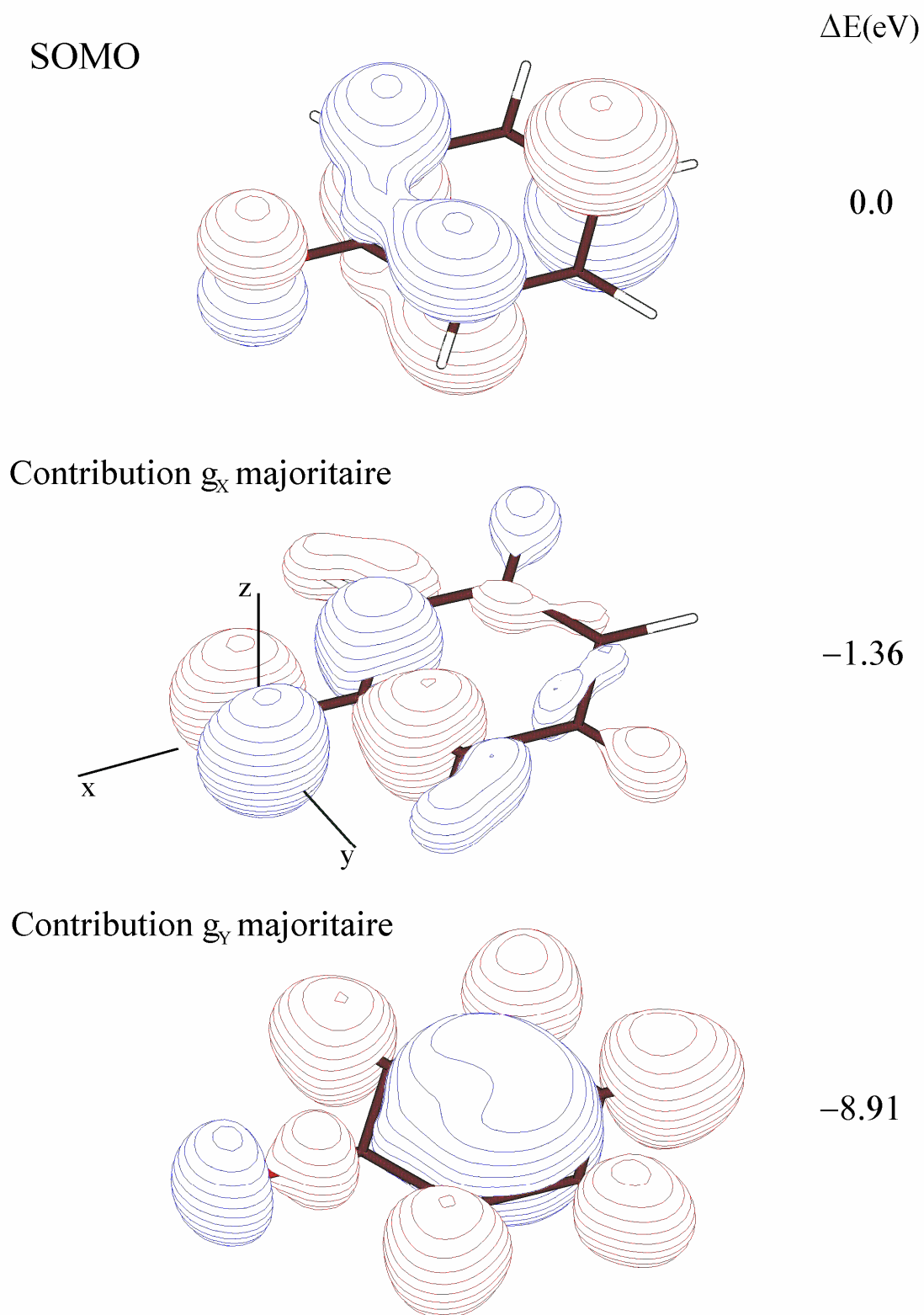
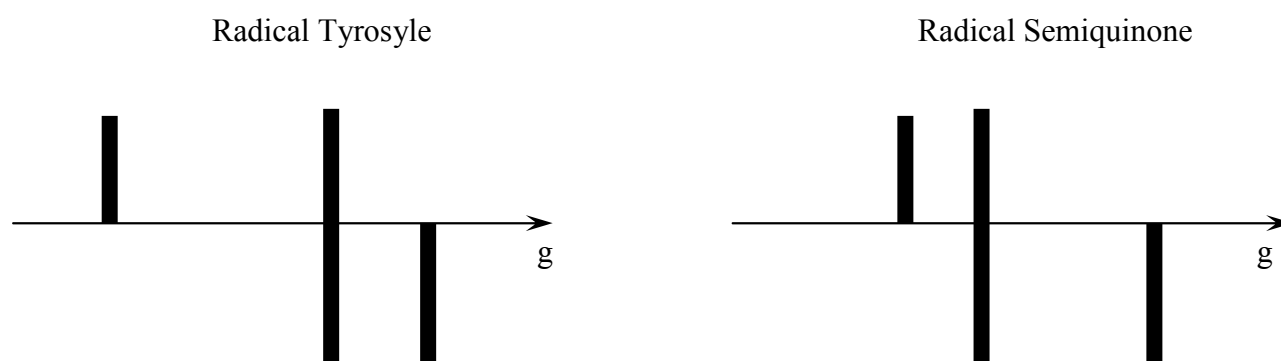


Figure 1. Représentation graphique de quelques orbitales moléculaires d'un radical tyrosyle. La SOMO est l'orbitale simplement occupée. Les orbitales contribuant majoritairement aux déplacements  $g_x$  et  $g_y$  par couplage spin-orbite sont représentées et leurs énergies relatives indiquées.

simplement occupée, l'énergie d'excitation correspondante étant  $\Delta E'_{n\pi^*}$ . La figure 1 représente, dans le cas d'un radical tyrosyle, l'orbitale moléculaire simplement occupée ainsi que les orbitales moléculaires qui contribuent essentiellement au déplacement de  $g_x$  (orbitale à caractère  $p_y$  sur l'oxygène) et au déplacement de  $g_y$  (orbitale à caractère  $p_x$  sur l'oxygène) avec leurs énergies relatives. Le fait que l'orbitale moléculaire contribuant au déplacement de  $g_x$  soit proche de la SOMO et que celle contribuant au déplacement de  $g_y$  soit 'enfouie' explique d'une part la forme des spectres RPE pour les radicaux tyrosyles (l'espacement des résonances à  $g_x$  et  $g_y$  est supérieur à l'espacement des résonances à  $g_y$  et  $g_z$ ) et d'autre part que l'on observe un déplacement visible de la résonance à  $g_x$  sous l'effet d'une interaction électrostatique et peu ou pas de déplacement pour la résonance à  $g_y$  dans les mêmes conditions. Dans le cas des semiquinones, les énergies relatives diffèrent et conduisent à une forme de signal pour laquelle l'espacement des résonances à  $g_x$  et  $g_y$  est inférieur à l'espacement entre les résonances à  $g_y$  et  $g_z$ ; l'effet d'une interaction électrostatique reste cependant visible principalement sur la résonance à  $g_x$ . Les spectres des radicaux tyrosyle et semiquinone sont représentés sous forme de spectres en bâton sur le schéma 1.



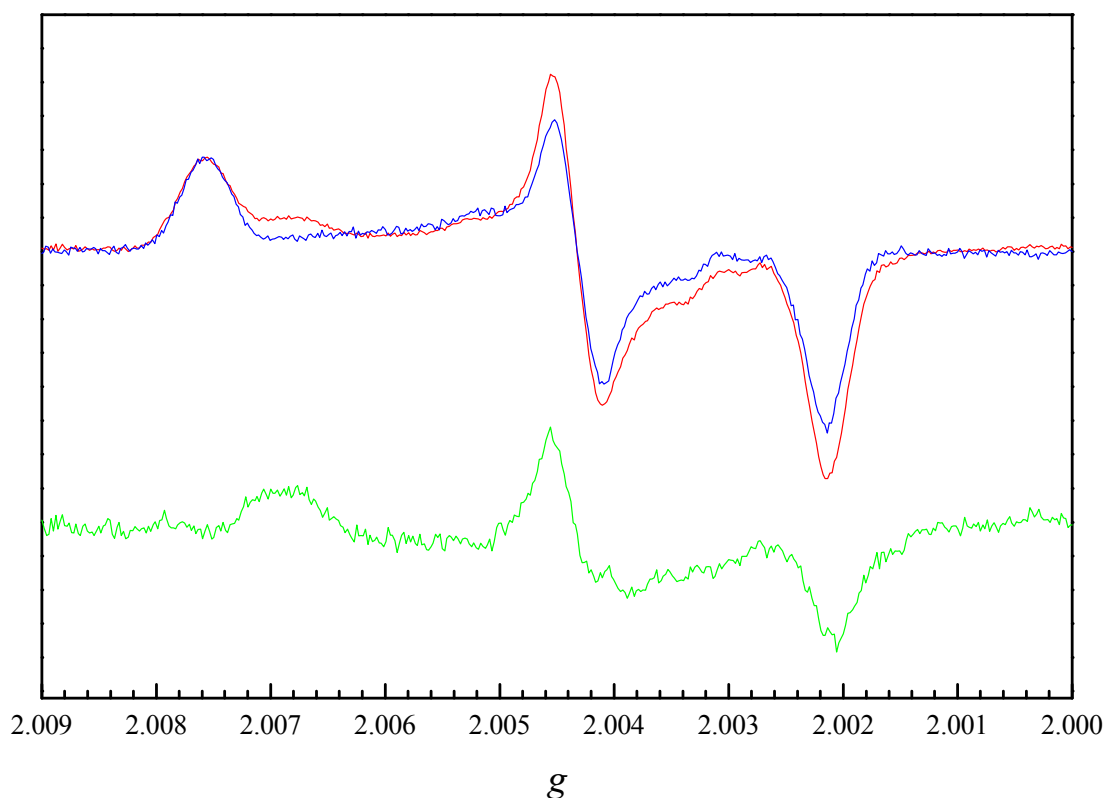
**Schéma 1.** Représentation schématique des spectres RPE à champ intense pour les radicaux tyrosyle et semiquinone mettant en évidence la différence de symétrie au niveau de la répartition des valeurs principales de  $g$ .

### III. LES RADICAUX $Y_D^\bullet$ ET $Y_Z^\bullet$ DANS LE PHOTOSYSTEME II

Dans les préparations de PS II pour lesquelles le cluster à manganèse a été enlevé par un traitement au Tris-HCl, il est possible de piéger le radical tyrosyle  $Y_Z^\bullet$ . De nombreuses études sur le système dépourvu de manganèse ont mis en évidence des différences nettes entre le radical tyrosyle stable  $Y_D^\bullet$  et le radical catalytiquement actif  $Y_Z^\bullet$ <sup>10</sup>. En particulier, il a été montré que  $Y_D^\bullet$  a une structure rigide alors que la structure de  $Y_Z^\bullet$  est plus mobile<sup>11</sup>. D'autre part, l'environnement de  $Y_D^\bullet$

est protégé du milieu extérieur alors que la poche contenant  $Y_Z^\bullet$  est très accessible au solvant<sup>12</sup>. Enfin, les cinétiques de réduction de  $Y_Z^\bullet$  dépendent du pH<sup>10</sup> (la réduction est plus lente à haut pH) et le rendement de piégeage du radical est meilleur à haut pH.

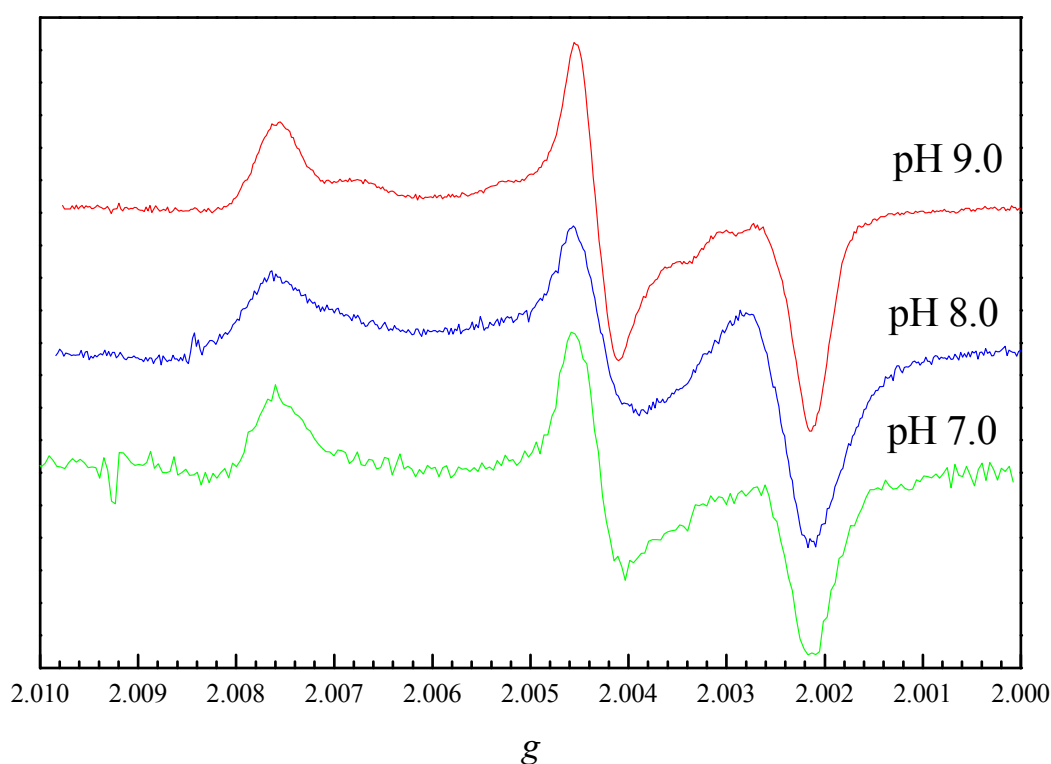
Le spectre d'un échantillon de PS II à pH 9.0 dans lequel  $Y_Z^\bullet$  a été piégé est représenté sur la figure 2. Au signal de  $Y_D^\bullet$  se superpose celui d'un autre radical attribué à  $Y_Z^\bullet$  dont la présence est également vérifiée dans les spectres à 9 GHz. Le spectre de différence est présenté au bas de la figure. Deux choses se remarquent sur le spectre de  $Y_Z^\bullet$  comparé à  $Y_D^\bullet$  : le signal à  $g_x$  est plus large et sa position est différente. Le spectre de  $Y_Z^\bullet$ , obtenu dans des mutants du PS II ne contenant pas



**Figure 2.** Spectres RPE obtenus à 285 GHz pour un échantillon de PS II traité au Tris-HCl dans lequel  $Y_Z^\bullet$  a été piégé (spectre rouge). Le spectre bleu a été enregistré après adaptation à l'obscurité à 273 K pendant 2 min pour réduire  $Y_Z^\bullet$ . Le spectre vert est le spectre de différence obtenu. Conditions expérimentales :  $\nu_{mw}$ =285.741 GHz, amplitude de modulation 1.0 mT, fréquence de modulation 3.34 kHz, température 4.3 K.

$Y_D^\bullet$  a déjà été obtenu à pH 6. De façon similaire, la partie à  $g_x$  était large. Ceci est interprété comme le signe d'un environnement électrostatique distribué, ce qui est attendu d'après les études d'ESEEM faites sur  $Y_Z^\bullet$ <sup>12</sup>. D'autre part, à pH 9, la valeur de  $g_x$  est déplacée vers une plus basse

valeur de  $g$ . Dans l'étude faite à pH 6, les valeurs de  $g$  obtenues étaient les mêmes que dans le cas de  $Y_D^\bullet$ . La valeur de  $g_x$  montre donc une dépendance vis-à-vis du pH, ce qui est en accord avec un site protéique accessible au solvant. Les spectres à 285 GHz ont également été enregistrés pour d'autres valeurs de pH (voir figure 3). Il semble que le signal à  $g_x$  de  $Y_Z^\bullet$  se rapproche de celui de  $Y_D^\bullet$  quand le pH diminue, cependant le signal de  $Y_D^\bullet$  et le fait que le rendement de piégeage de  $Y_Z^\bullet$  diminue avec le pH rendent les observations difficiles. Pour tenter de déceler un comportement éventuel similaire pour  $Y_D^\bullet$ , une préparation de PS II a été incubée 48 h dans un tampon à pH 9.0 et



**Figure 3.** Spectres obtenus à 285 GHz sur des échantillons de PS II traités au Tris-HCl dans lesquels  $Y_Z^\bullet$  a été piégé à différents pH. Conditions expérimentales : amplitude de modulation 1.0 mT, fréquence de modulation 3.34 kHz, température 4.35 K au niveau de l'échantillon.

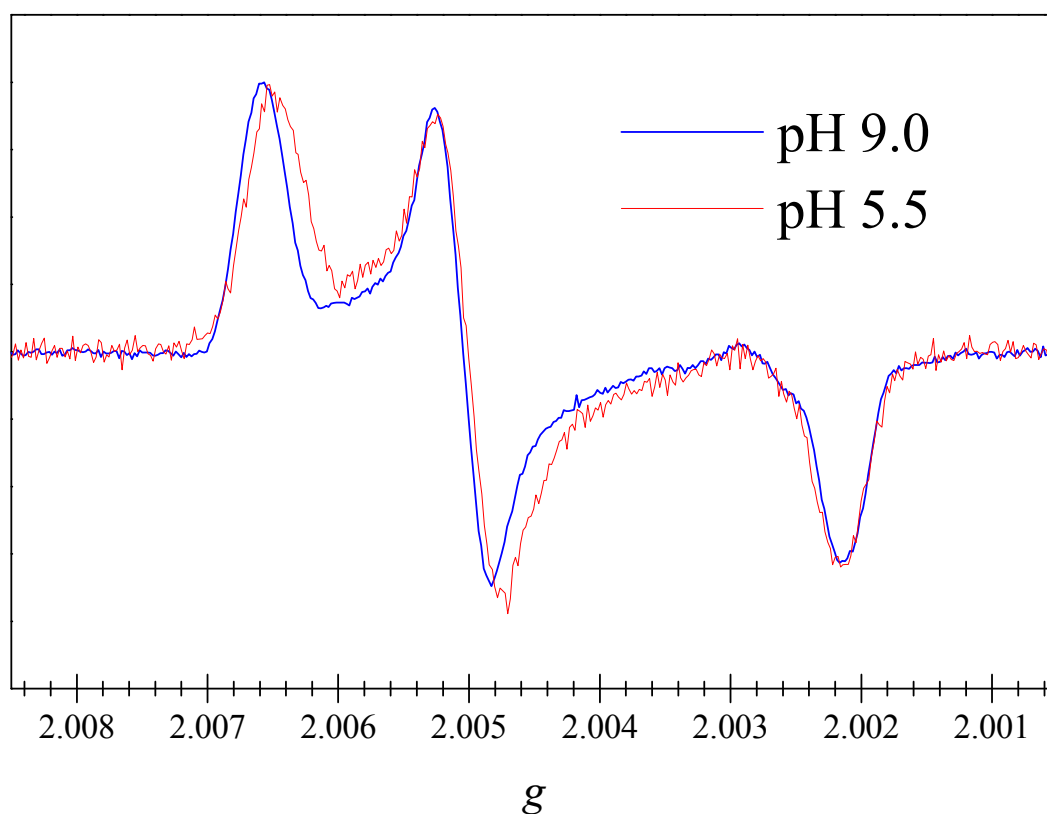
le spectre du radical enregistré à 285 GHz. Ce spectre ne présente aucune différence avec celui enregistré à pH 6.0.

Les mesures de RPE à champ intense confirment ainsi les différences déjà constatées entre les deux radicaux tyrosyles dans les préparations dépourvues du cluster à manganèse.  $Y_D^\bullet$  possède une

structure rigide dans un site protéique isolé du milieu extérieur alors que  $Y_Z^\bullet$ , dans le cas des échantillons traités au Tris-HCl, est dans un environnement électrostatique distribué dans un site protéique accessible au solvant et soumis aux variations de pH.

#### IV. OBSERVATION SUR $Q_A^{\bullet-}$

Dans les centres réactionnels des bactéries pourpres, la quinone  $Q_A$  forme une liaison hydrogène avec chacune de ses fonctions carbonyles. L'une des liaisons provient d'un résidu histidine qui coordonne également le fer non hémique et l'autre liaison d'un azote protoné du squelette



**Figure 4.** Spectres RPE obtenus à 285 GHz pour la semiquinone  $QA^{\bullet-}$  en milieu réducteur à pH 5.5 et à pH 9.0. Conditions expérimentales : amplitude de modulation 1.0 mT, fréquence de modulation 3.34 kHz, température au niveau de l'échantillon 4.35 K.

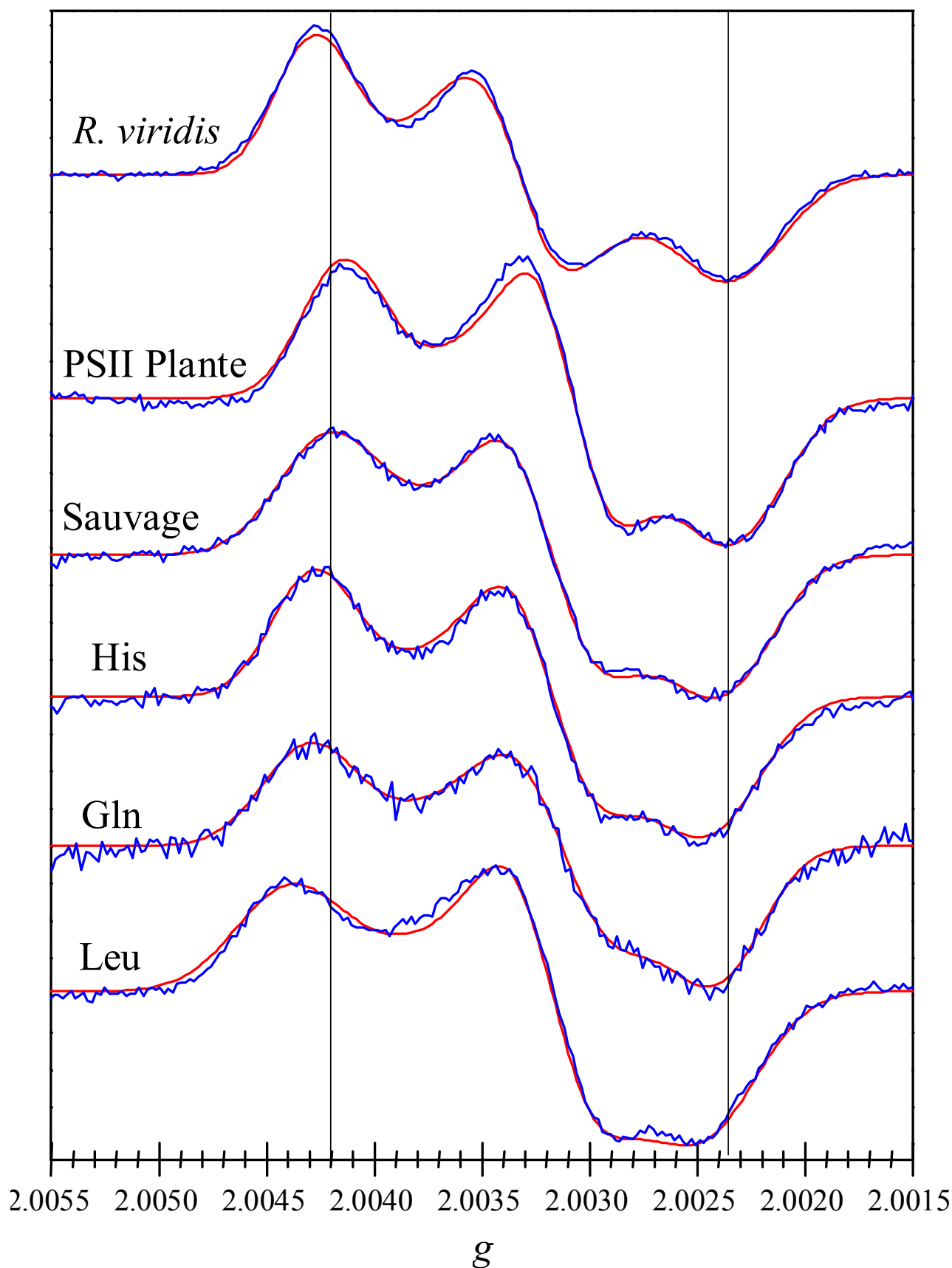
protéique. Des expériences d'ESEEM ont conduit à proposer un modèle de coordination semblable dans le cas du photosystème II<sup>13</sup>. En particulier, l'étude du couplage des azotes voisins au spin



électronique de la semiquinone a montré une dépendance en fonction du pH à la fois dans les échantillons traités au cyanure de potassium (fer non hémique bas spin  $S=0$ ) et dans les échantillons prétraités à pH 11 (enlèvement du fer non hémique). L'interprétation qui en a été faite fait intervenir des changements au niveau des liaisons hydrogène<sup>13</sup>. Ces changements sont globalement des variations dans l'environnement électrostatique du radical semiquinone et il était intéressant d'enregistrer les spectres RPE à champ intense pour des pH différents. La figure 4 montre les spectres obtenus à 285 GHz pour une préparation de PS II dans laquelle le fer non hémique a été enlevé par prétraitement à pH 11 et la semiquinone générée par réduction chimique au dithionite de sodium. Les spectres ont été enregistrés pour une préparation à pH 5.5 et une autre à pH 9.0. Le déplacement de la résonance à  $g_x$  est clairement visible sur la figure. La valeur de  $g_x$  diminue de  $1.10^{-4}$  lorsqu'on passe de pH 9.0 à pH 5.5. Ceci est en accord avec ce qui était attendu, à savoir que l'environnement de la semiquinone est sensiblement plus électropositif à bas pH qu'à haut pH, ce qui est en accord avec un renforcement de liaison hydrogène lorsqu'on diminue le pH.

## V. ETUDE DU RADICAL ANION PHEOPHYTINE

A la suite de l'étude de l'orientation du radical anion phéophytine dans le photosystème II par rapport à la membrane photosynthétique, l'orientation du tenseur  $g$  par rapport à la molécule a été proposée (voir chapitre II). En particulier, l'axe  $g_x$  est supposé passer par les azotes protonés des cycles I et III. Cette direction est pratiquement parallèle à la liaison carbonyle du cycle V. Dans les bactéries pourpres, on choisit ici l'exemple de *R. viridis*, l'acide glutamique 104 de la sous-unité L forme une liaison hydrogène forte avec le carbonyle du cycle V de la bactériophéophytine. Par homologie, dans le PS II le résidu acide glutamique 130 du polypeptide D1 est supposé être le donneur de liaison hydrogène sur le carbonyle du cycle V de la phéophytine. Comme l'oxygène de cette fonction carbonyle porte une partie appréciable de la densité de spin du radical anion<sup>14</sup>, il est raisonnable de penser que la valeur de  $g_x$  du radical va être sensible à la force de cette liaison hydrogène. Une collaboration avec le laboratoire du Professeur Richard Sayre à l'Université d'Etat de l'Ohio nous a permis d'obtenir des mutants du photosystème II chez *Chlamydomonas reinhardtii* pour lesquels l'acide glutamique 130 du polypeptide D1 a été spécifiquement muté en histidine, glutamine ou leucine.



**Figure 5.** Spectres RPE obtenus à 285 GHz pour le radical anion phéophytine (bactériophéophytine pour *R. viridis*) dans les différents échantillons étudiés. Bleu: spectres expérimentaux; rouge: simulations. Conditions expérimentales: amplitude de modulation 2.0 mT (sauf *R. viridis*, 1.0 mT), température 4.2 K (sauf Leu 3.0 K). Voir texte et table 1 pour les paramètres de simulation.

Le radical anion phéophytine a été généré dans les échantillons en les éclairant à 0 °C pendant 5 minutes en milieu très réducteur équilibré à -450 mV en utilisant le dithionite de sodium. Les échantillons ont été ensuite congelés. Les spectres RPE obtenus à 285 GHz pour le radical anion de la phéophytine dans le type sauvage et les mutants D1 Glu130His, D1 Glu130Gln et D1 Glu130Leu sont représentés sur la figure 5. Tous les spectres ont pu être simulés de façon satisfaisante en utilisant un tenseur  $g$  unique et un tenseur d'élargissement de raie dont les axes principaux coïncident à ceux du tenseur  $g$ . L'utilisation du tenseur d'élargissement était nécessaire pour rendre compte des largeurs de raie différentes observées expérimentalement pour  $g_x$ ,  $g_y$  et  $g_z$  et qui sont attribuées aux couplages hyperfins non résolus. Les couplages hyperfins n'ont pas été explicitement considérés pour les simulations. Les résultats des simulations sont regroupés dans la table 1.

	$g_x$	$g_y$	$g_z$	$\Delta H_x$ (mT)	$\Delta H_y$ (mT)	$\Delta H_z$ (mT)
Plante <sup>a</sup>	2.00424	2.00316	2.00237	2.1	2.0	2.1
Glu130	2.00420	2.00320	2.00236	2.9	2.2	2.8
Glu130His	2.00429	2.00319	2.00242	2.4	2.2	2.9
Glu130Gln	2.00431	2.00316	2.00240	2.7	2.6	2.6
Glu139Leu	2.00440	2.00321	2.00243	3.0	2.3	2.9
ZORA Pas de charge	2.00463	2.00325	2.00204			
ZORA Charge à 1.8Å	2.00425	2.00344	2.00206			
BPheo <sup>-a</sup>	2.00437	2.00340	2.00239	2.0	2.1	2.2
ZORA Pas de charge	2.00487	2.00335	2.00235			
ZORA Charge à 2.0Å	2.00453	2.00339	2.00228			

**Table 1.** Valeurs de  $g$  obtenues par simulation des données expérimentales ou par calcul ZORA pour les radicaux anions phéophytine et bactériophéophytine.  $\Delta H_x$ ,  $\Delta H_y$  et  $\Delta H_z$  sont les largeurs de raies globales pour les simulations.

(a) voir chapitre II.

Le radical anion phéophytine dans le type sauvage de *C. reinhardtii* a un spectre RPE pratiquement identique à celui obtenu pour le radical dans le photosystème II des plantes (voir chapitre II). La relation entre liaison hydrogène et valeurs de  $g$  est évidente pour la valeur  $g_x$ . De la même façon que pour les radicaux tyrosyles et les semiquinones, la valeur de  $g_x$  diminue lorsque la force de la liaison hydrogène augmente. La force de la liaison hydrogène est la plus grande dans le cas du sauvage. Le résidu histidine n'est pas aussi flexible que l'acide glutamique et la glutamine est un donneur de liaison hydrogène plus pauvre. Le résidu leucine ne peut clairement pas former de liaison hydrogène et ne possède pas de charge. La différence entre le sauvage et les mutants histidine et glutamine est faible mais mesurable. La différence entre le sauvage et le mutant leucine est la plus grande et est clairement observable sur les spectres expérimentaux. Bien que ces déplacements soient comparables à l'incertitude absolue de notre mesure ( $1.10^{-4}$  en valeur de  $g$ ), l'anisotropie du facteur  $g$ , mesurée par la différence  $|g_x - g_z|$  et pour laquelle l'incertitude est inférieure à  $5.10^{-5}$ , montre aussi clairement une diminution lorsque la force de la liaison hydrogène augmente. Ces changements dans la valeur de  $g_x$  viennent étayer expérimentalement l'hypothèse faite sur l'orientation du tenseur  $g$  vis-à-vis de la molécule. Ils démontrent également que le résidu Glu130 du polypeptide D1 est en contact électrostatique avec le radical anion phéophytine. De la même façon que le résidu Glu104 de la sous-unité L dans *R. viridis*, Glu 130 est sans doute donneur de liaison hydrogène pour l'oxygène de la fonction carbonyle du cycle V.

Afin d'étudier l'effet de l'environnement électrostatique sur les valeurs de  $g$  du radical anion phéophytine, nous avons effectué une série de calculs théoriques des valeurs de  $g$  en utilisant la méthode relativiste ZORA (zeroth order regular approximation) implémentée dans le programme ADF (Amsterdam Density Functional)<sup>15-20</sup>. La molécule utilisée pour les calculs est basée sur la structure de bactériophéophytine disponible pour *R. viridis*. Cette structure a été modifiée pour obtenir une phéophytine. La structure complète n'a pas été utilisée pour des raisons d'efficacité de calcul numérique. Tous les groupes attachés au macrocyle et qui ne sont pas conjugués avec ce cycle ont été remplacés par des atomes d'hydrogène. La géométrie de la molécule ainsi obtenue a été optimisée en utilisant la méthode PM3 du logiciel Gaussian 94<sup>21</sup>. La géométrie optimisée obtenue pour le macrocycle est plane (les valeurs de  $g$  obtenues sur la structure non optimisée en forme de selle ne présentent pas de différences significatives). Cette structure à géométrie optimisée a été utilisée pour tous les calculs, y compris ceux impliquant une charge externe ponctuelle (la structure du macrocycle en présence d'une charge ponctuelle externe n'a pas été optimisée puisque ni le logiciel ADF ni Gaussian 94 ne le permette). Les calculs ont utilisé des fonctions d'onde zeta

simple pour les atomes de carbone et d'hydrogène et des fonctions zeta double pour les atomes d'azote et d'oxygène. Pour les atomes de carbone, d'azote et d'oxygène, des fonctions d'onde fixes de cœur ont été utilisées. Une charge ponctuelle simple a été incorporée dans les calculs pour simuler des effets électrostatiques. Cette charge ponctuelle était située à  $120^\circ$  de la liaison carbonyle du cycle V à des distances variables (voir figure 6).

Les valeurs de  $g$  obtenues en utilisant la méthode ZORA sont en accord modeste avec celles mesurées expérimentalement pour le radical anion de la phéophytine dans le PS II. Pour toutes les distances charge–oxygène, l'axe  $g_x$  calculé était situé à moins de  $10^\circ$  de l'axe de la liaison carbonyle et l'axe  $g_z$  était perpendiculaire au plan du macrocycle. La dépendance de la valeur  $g_x$  par rapport à la distance charge–oxygène est représentée sur la figure 7. Les calculs théoriques prédisent un déplacement de la valeur de  $g_x$  de  $-3.10^{-4}$  pour une charge positive ponctuelle placée à  $1.8 \text{ \AA}$  de l'oxygène. Des calculs similaires effectués sur la bactériophéophytine ont donné des résultats en accord remarquable avec les observations expérimentales. L'orientation du tenseur est essentiellement identique à celle de la phéophytine. Le calcul donnant les valeurs les plus proches de celles mesurées est obtenu pour une charge ponctuelle située à  $2 \text{ \AA}$  de l'oxygène. Dans la structure cristallographique, l'atome d'oxygène de la fonction carboxyle de l'acide glutamique Glu104 est situé à  $2.7 \text{ \AA}$  de l'oxygène de la fonction carbonyle du cycle V de la bactériophéophytine.

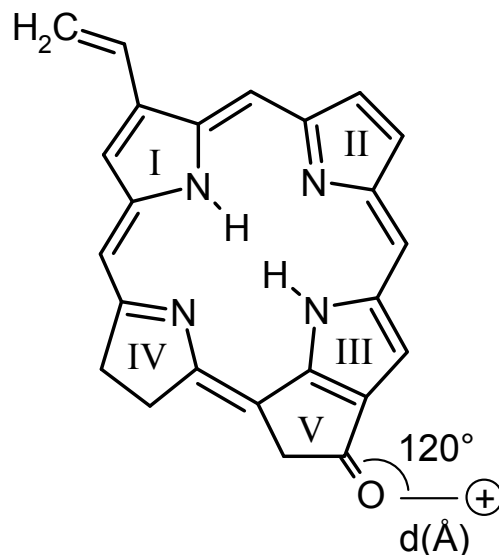
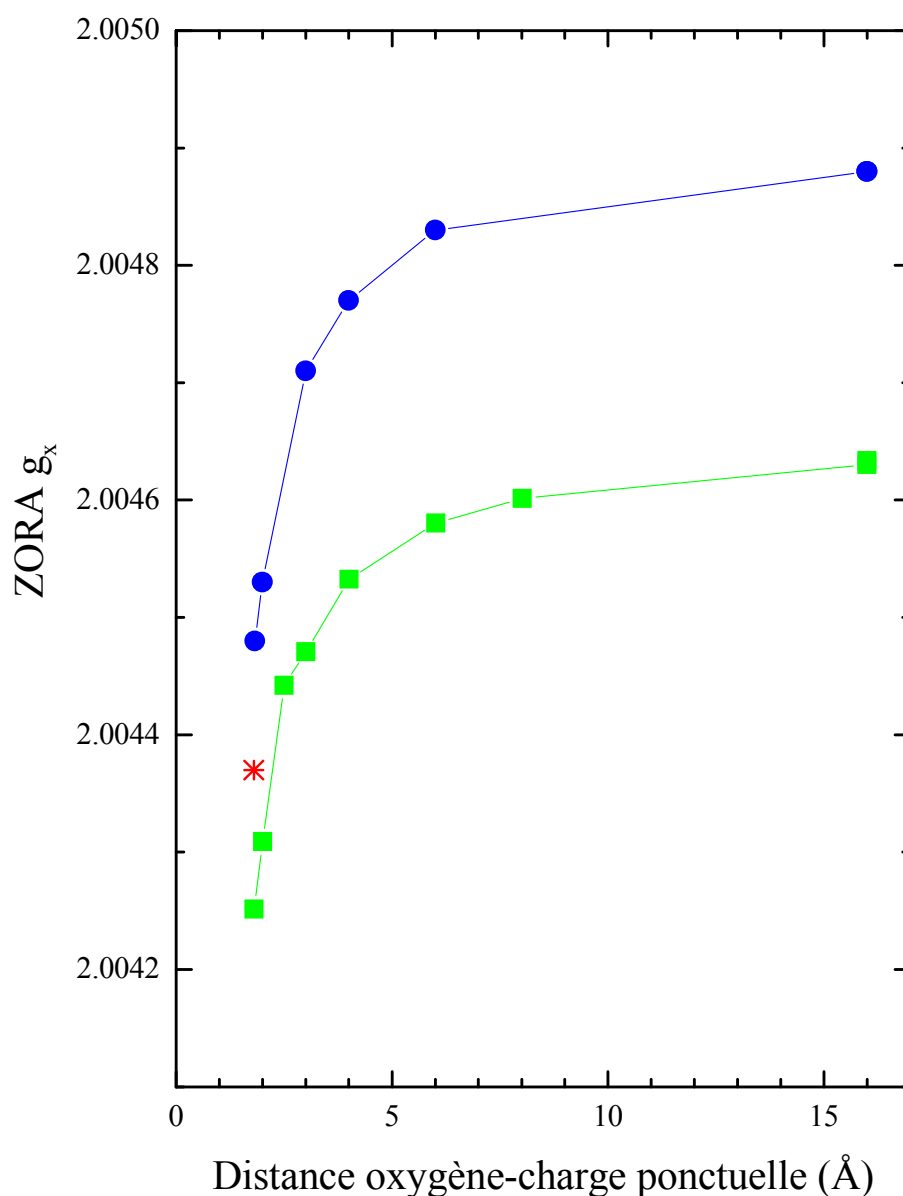


Figure 6. Molécule de phéophytine utilisée pour les calculs ZORA.

Les calculs théoriques suggèrent que les différences observées pour les spectres RPE de la bactériophéophytine (*R. viridis*) et de la phéophytine (PS II) sont principalement dues à la différence de structure. Les calculs ZORA sont également en faveur de l'attribution des changements observés entre le type sauvage et les mutants de *C. reinhardtii* à des changements électrostatiques dans l'environnement du radical et en particulier des variations au niveau de la liaison hydrogène formée entre l'oxygène du carbonyle du cycle V et le résidu acide glutamique Glu130 du polypeptide D1. Ils confirment également l'orientation proposée pour le tenseur  $g$  par rapport à la molécule (direction  $g_x$  suivant la liaison carbonyle du cycle V). L'amplitude du



**Figure 7.** Valeurs calculées pour  $g_x$  en fonction de la distance oxygène-charge positive ponctuelle pour les modèles de phéophytine (vert) et bactériophéophytine (bleu). L'étoile correspond à la valeur mesurée pour *R. viridis*.

déplacement de la valeur  $g_x$  observé expérimentalement entre le sauvage et les mutants indiquent que Glu130 est un donneur de liaison hydrogène pour le carbonyle de la phéophytine, de façon analogue au résidu Glu104 dans les bactéries pourpres.

## VI. CONCLUSION

Il avait déjà été montré que les valeurs de  $g$  sont une sonde très sensible à l'environnement électrostatique local pour les radicaux tyrosyles et semiquinones. Deux exemples d'application, les radicaux  $Y^{\bullet}$  et la semiquinone  $Q_A^{\bullet-}$  du photosystème II, ont été présentés dans ce chapitre. Une troisième classe de radicaux, les radicaux anions phéophytine et bactériophéophytine, viennent s'ajouter à cette étude. Les données obtenues ont permis d'apporter un argument expérimental à l'attribution de la direction  $g_x$  suivant la liaison carbonyle du cycle V de ces radicaux (axe joignant les atomes d'azote protonés du macrocycle). La mesure précise des valeurs de  $g$  par utilisation de la RPE à champ intense a mis en évidence des variations de la valeur  $g_x$  lorsque le résidu acide glutamique 130 du polypeptide D1, analogue de l'acide glutamique L104 qui est donneur de liaison hydrogène pour la bactériophéophytine chez *R. viridis*, est modifié par mutagenèse dirigée. De la même manière que dans le cas de radicaux tyrosyles et semiquinones, la valeur de  $g_x$  augmente lorsque la force de la liaison hydrogène diminue, c'est-à-dire lorsque l'environnement devient plus électronégatif.

## RÉFÉRENCES

- [1] UN, S., ATTA, M., FONTECAVE, M. & RUTHERFORD, A. W. (1995)  $g$ -values as a probe of the local protein environment: high-field EPR of tyrosyl radicals in ribonucleotide reductase and photosystem II. *Journal of the American Chemical Society* **117**, 10713-19.
- [2] UN, S., TANG, X. S. & DINER, B. A. (1996) 245 GHz high-field EPR study of tyrosine-D zero and tyrosine-Z zero in mutants of photosystem II. *Biochemistry* **35**, 679-84.
- [3] IVANCICH, A., JOUVE, H. M. & GAILLARD, J. (1996) EPR evidence for a tyrosyl radical intermediate in bovine liver catalase. *Journal of the American Chemical Society* **118**, 12852-12853.
- [4] IVANCICH, A., MATTIOLI, T. A. & UN, S. (1999) Effect of protein microenvironment on tyrosyl radicals. A high-field (285 GHz) EPR, resonance raman, and hybrid density functional study. *Journal of the American Chemical Society* **121**, 5743-5753.
- [5] ENGSTRÖM, M., HIMO, F., GRÄSLUND, A., MINAEV, B., VAHTRAS, O. & AGREN, H. (2000) Hydrogen Bonding to Tyrosyl Radical Analyzed by Ab Initio  $g$ -Tensor Calculations. *J Phys Chem A* **104**, 5149-5153.
- [6] KNÜPLING, M., TÖRRING, J. T. & UN, S. (1997) The relationship between the molecular structure of semiquinone radicals and their  $g$ -values. *Chemical Physics* **219**, 291-304.
- [7] STONE, A. J. (1963) Gauge invariance of the  $g$  tensor. *Proc R Soc London, Ser A* **271**, 424-34.
- [8] STONE, A. J. (1963)  $g$  factors of aromatic free radicals. *Mol Phys* **6**, 509-15.
- [9] STONE, A. J. (1964)  $g$  tensors of aromatic hydrocarbons. *Mol Phys* **7**, 311-16.
- [10] DINER, B. A., FORCE, D. A., RANDALL, D. W. & BRITT, R. D. (1998) Hydrogen bonding, solvent exchange, and coupled proton and electron transfer in the oxidation and reduction of redox-active tyrosine Y(Z) in Mn-depleted core complexes of photosystem II. *Biochemistry* **37**, 17931-43.
- [11] WARNCKE, K., BABCOCK, G. T. & MCCracken, J. (1994) Structure of the YD tyrosine radical in photosystem II as revealed by 2H electron spin echo envelope modulation (ESEEM) spectroscopic analysis of hydrogen hyperfine interactions. *J Am Chem Soc* **116**, 7332-7340.
- [12] TOMMOS, C., MCCracken, J., STYRING, S. & BABCOCK, G. T. (1998) Stepwise disintegration of the photosynthetic oxygen-evolving complex. *Journal of the American Chemical Society* **120**, 10441-10452.
- [13] DELIGIANNAKIS, Y., HANLEY, J. & RUTHERFORD, A. W. (1999) 1D- and 2D-ESEEM Study of the Semiquinone Radical QA- of Photosystem II. *J Am Chem Soc* **121**, 7653.



- [14] O'MALLEY, P. J. (2000) Hybrid density functional studies of pheophytin anion radicals: Implications for initial electron transfer in photosynthetic reaction centers. *Journal of Physical Chemistry B* **104**, 2176-2182.
- [15] *Amsterdam Density Functional Program Package*, ADF1999.02
- [16] BAERENDS, E. J., ELLIS, D. E. & ROS, P. (1973) *Chemical Physics* **2**, 41.
- [17] VERSLUIS, L. & ZIEGLER, T. (1988) *J Chem Phys* **322**, 88.
- [18] TE VELDE, G. & BAERENDS, E. J. (1992) *J. Comput. Phys.* **99**, 84.
- [19] FONSECA GUERRA, C., SNIJDERS, J. G., TE VELDE, G. & BAERENDS, E. J. (1998) *Theor. Chem. Acc.* **99**, 391.
- [20] VAN LENTHE, E., SNIJDERS, J. G. & BAERENDS, E. J. (1996) *J. Chem. Phys.* **105**, 6505.
- [21] FRISCH, M. J., TRUCKS, G. W., SCHLEGEL, H. B., GILL, P. M. W., JOHNSON, B. G., ROBB, M. A., CHEESEMAN, J. R., KEITH, T., PETERSSON, G. A., MONTGOMERY, J. A., RAGHAVACHARI, K., AL-LAHAM, M. A., ZAKRZEWSKI, V. G., ORTIZ, J. V., FORESMAN, J. B., CIOSLOWSKI, B. B., STEFANOV, B. B., NANAYAKKARA, A., CHALLACOMBE, M., PENG, C. Y., AYALA, P. Y., CHEN, W., WONG, M. W., ANDRES, J. L., REPLOGE, E. S., GOMPERTS, R., MARTIN, R. L., FOX, D. J., BINKLEY, J. S., DEFREES, D. J., BAKER, J., STEWART, J. P., HEAD-GORDON, M., GONZALES, C. & POPLE, J. A. *Gaussian 94*, Revision D.2 Gaussian Inc.: Pittsburg, PA



Ce travail de thèse a porté sur l'utilisation de la résonance paramagnétique électronique à champ intense pour l'étude de radicaux organiques dans les métalloprotéines. Les applications ont principalement été centrées sur l'étude du photosystème II, l'enzyme responsable du dégagement d'oxygène lors de la photosynthèse chez les plantes et les cyanobactéries.

Le principal avantage de la RPE à champ intense est la résolution accrue pour la mesure des valeurs de  $g$ . Le facteur  $g$  étant une grandeur tensorielle, elle contient des informations géométriques qui ont été utilisées pour déterminer l'orientation par rapport à la membrane de certains radicaux intervenant lors de la séparation de charge dans le photosystème II. Cette étude a permis d'obtenir des informations structurales importantes, en particulier en l'absence de structure cristallographique pour l'enzyme.

Une autre application importante de la RPE à champ intense est l'étude de l'environnement des radicaux à travers la dépendance des valeurs de  $g$  vis-à-vis des interactions électrostatiques. Cette propriété est particulièrement importante et intéressante dans l'étude des systèmes bioinorganiques et peut apporter d'importantes informations au niveau structure/fonction.

L'étude de systèmes couplés occupe également une place importante dans ce travail de thèse et les informations que peut fournir la RPE à champ intense dans ce domaine se fait surtout sentir à travers une approche multifréquence du problème étudié. L'un des résultats les plus importants concerne les systèmes pour lesquels deux spins  $S=1/2$  sont faiblement couplés; dans le cas d'une interaction d'échange, le spectre enregistré à champ intense et basse température permet de déterminer directement la nature ferromagnétique ou antiferromagnétique du couplage.

Enfin, l'une des applications de la RPE à champ intense concerne les centres métalliques paramagnétiques. L'intérêt principal étant soit pour des systèmes possédant des champs internes faibles, auquel cas l'utilisation d'un champ appliqué intense conduit à une simplification du spectre et à une interprétation plus facile des données, soit des systèmes possédant des champs internes forts, auquel cas on peut atteindre des transitions à hautes fréquences qui ne sont pas observables par RPE conventionnelle à basse fréquence. Aucun spectre RPE à champ intense n'a pour l'instant été rapporté pour les centres métalliques du photosystème II ou d'autres métalloprotéines importantes. L'obtention de tels spectres constitue l'une des perspectives les plus attrayantes pour l'étude des métalloprotéines et le développement de cette technique.

# ANNEXE 1



## PREPARATIONS BIOCHIMIQUES

## **I. Préparation des membranes de photosystème II.**

- a. Déveiner les feuilles d'épinard, les laver à l'eau froide et les rincer deux fois à l'eau distillée.
- b. Broyer les feuilles en utilisant le tampon de broyage (environ 250 mL de tampon pour 300 g de feuille)
- c. Filtrer dans un erlenmeyer refroidi sur glace.
- d. Verser le filtrat dans des bouteilles de centrifugation et centrifuger à 10 000 tours par minute pendant 12 minutes. Garder le culot.
- e. Au moyen d'un pinceau, faire une suspension du culot dans le tampon n° 1. Verser dans des bouteilles propres et centrifuger à 10 000 tours par minutes pendant 12 minutes. Garder le culot.
- f. Etape critique : faire une suspension du culot en utilisant le plus faible volume de tampon n°2. Homogénéiser. Déterminer la concentration en chlorophylle (mg/mL). Mesurer le volume total de la suspension et déterminer la quantité totale de chlorophylle (mg). Pour l'incubation avec le détergent, il faut une concentration finale de chlorophylle de 2 mg/mL et un rapport détergent (Triton X-100):chlorophylle de 30:1. Calculer le volume de solution de détergent (solution à 25%) à ajouter ainsi que le volume de tampon n°2 pour la dilution.
- g. Placer la suspension dans un bécher froid sur la glace avec agitation lente, diluer avec le tampon n°2 et ajouter lentement la solution de détergent. Laisser sous agitation lente et dans l'obscurité totale pendant 30 minutes.
- h. Verser dans des tubes et centrifuger à 20 000 tours par minutes (rotor SS34) pendant 30 minutes. Garder le culot et en faire une suspension dans le tampon SMN avec un pinceau (ne pas suspendre le culot blanc d'amidon).
- i. Centrifuger à 20 000 tours par minute pendant 30 minutes. Garder le culot.
- j. Suspendre en utilisant un faible volume de tampon SMN (concentration finale de l'ordre de 8 mg Chl/mL). Homogénéiser et mettre dans des cryotubes de 1 mL. Congeler dans l'azote liquide et stocker à  $-80^{\circ}\text{C}$  jusqu'à utilisation.

### *Tampons :*

Tampon de broyage : Hepes pH 7.5 20 mM, NaCl 0.4 M,  $\text{MgCl}_2$  4 mM, EDTA 1 mM, albumine de sérum de bœuf 2 g/L

Tampon n°1 : MES pH 6.0 20 mM, NaCl 150 mM,  $\text{MgCl}_2$  4 mM, EDTA 1 mM

Tampon n°2 : MES pH 6.0 50 mM, NaCl 15 mM,  $\text{MgCl}_2$  5 mM, ascorbate de sodium 1 mM, EDTA 1 mM

Tampon SMN : sucrose 0.4 M, MES pH 6.0 50 mM, NaCl 15 mM

## **II. Préparation des centres réactionnels (cores) de photosystème II.**

Diluer la préparation membranaire de photosystème II pour obtenir une concentration de 1 mg Chl/mL dans un volume  $v_0$ . Ajouter un même volume  $v_0$  d'une solution d'octyl- $\beta$ -D-thioglucopyranoside à 0.8 % dans un tampon SMN. Incuber 10 minutes sur la glace dans l'obscurité complète. Ajouter un volume  $v_0$  de tampon SMN contenant 30 mM de chlorure de magnésium. Incuber 5 minutes sur la glace. Centrifuger 30 minutes à 20 000 tours par minute et conserver le surnageant. Ajouter 1.5  $v_0$  de tampon MN au surnageant et centrifuger à 20 000 tours par minute pendant 40 minutes. Les centres réactionnels de PS II forment le culot. Faire une suspension dans

un faible volume de SMN contenant 20 mM de chlorure de calcium. Congeler dans l'azote liquide et stocker à  $-80^{\circ}\text{C}$  jusqu'à utilisation.

### **III. Traitement au Tris-HCl.**

Ce traitement élimine le cluster à manganèse ainsi que les polypeptides extrinsèques 17, 24 et 33 kDa du photosystème II. Les membranes de photosystème II sont incubées sur glace à une concentration de 0.5 mg Chl/mL dans un tampon Tris 0.8 M à la lumière ambiante pendant 20 minutes. Les membranes ainsi traitées sont lavées deux fois (centrifugation et suspension) à l'obscurité avec un tampon MES pH 6.0 50 mM, EDTA 1 mM. La suspension finale se fait dans le tampon SMN.

### **IV. Traitement à l'acétate.**

Le traitement à l'acétate est effectué en lavant la préparation membranaire de photosystème II deux fois dans un tampon SM (SMN sans chlorure de sodium) à pH 5.5 contenant 0.5 M d'acétate de sodium. Dans le cas des centres réactionnels, un seul lavage est effectué directement après leur préparation.

### **V. Enlèvement des ions $\text{Ca}^{2+}$ .**

La déplétion en calcium est effectuée en diluant la préparation membranaire de photosystème II avec un tampon SMN jusqu'à une concentration de 1 mg Chl/mL. Un volume égal d'un tampon SMN contenant 4 M de chlorure de sodium est ajouté. Le mélange est incubé sur la glace à la lumière ambiante pendant 20 minutes. L'EDTA est ajouté pour obtenir une concentration finale de 1 mM et la solution incubée pendant 5 minutes à l'obscurité. La préparation est centrifugée à 20 000 tours par minute pendant 20 minutes et le culot lavé deux fois avec le tampon SMN.

### **VI. Enlèvement du fer non-hémique.**

L'enlèvement du fer se fait sur des membranes photosynthétiques traitées au Tris-HCl. Ces membranes sont incubées pendant 10 minutes à température ambiante et à l'obscurité dans un tampon glycine pH 11.0 50 mM, sucrose 0.4 M, NaCl 10 mM, EDTA 1 mM. La préparation est ensuite centrifugée et lavée une fois avec un tampon glycine pH 9.0.

### **VII. Traitement au cyanure.**

Pour convertir le fer non-hémique haut-spin en bas-spin, les membranes sont incubées pendant 3 heures à l'obscurité dans un tampon Hepes pH 8.0 60 mM,  $\text{MgCl}_2$  5 mM, NaCl 10 mM, KCN 350 mM. La préparation est ensuite centrifugée et mise en suspension dans un tampon Hepes pH 8.0.

# ANNEXE 2



# PUBLICATIONS

# Multifrequency High-Field EPR Study of the Interaction between the Tyrosyl Z Radical and the Manganese Cluster in Plant Photosystem II

Pierre Dorlet, Alain Boussac, A. William Rutherford, and Sun Un\*

Section de Bioénergétique, Département de Biologie Cellulaire et Moléculaire, CNRS URA 2096, Bât. 532, CEA Saclay, F-91191 Gif-sur-Yvette Cedex, France

Received: July 26, 1999; In Final Form: October 1, 1999

The light-driven oxidation of water to dioxygen is catalyzed by the enzyme photosystem II. A four-manganese ion cluster and a tyrosine,  $Y_Z$ , are present in the catalytic site. In preparations inhibited by addition of acetate or removal of the calcium cofactor, it is possible to trap the tyrosyl radical in interaction with the metal cluster. The coupled species is characterized by a broad split EPR signal at 9 GHz. In this work, high-field EPR has been used for further characterization of the coupling. The 285, 190 and 95 GHz EPR spectra of the interacting system are reported. Analysis of these spectra yielded exchange and dipolar couplings of the same magnitude as those found with 9 GHz EPR. However, the high-field spectra show that the coupling between the radical and the manganese cluster has opposite sign in acetate-treated compared to calcium-depleted samples. The sign difference indicates differences in the electronic structure of the radical–metal center pair. Comparisons are made between photosystem II and other enzymes containing radicals interacting with metal centers. Possible explanations for the difference in sign are proposed. The difficulty in obtaining reliable structural information for the spin coupled system is addressed.

## Introduction

The photosynthetic oxidation of water to oxygen occurs in photosystem II (PS II), an enzyme found in green plants and cyanobacteria.<sup>1</sup> During the catalytic cycle, photon absorption by chlorophylls induces electron transfer that leads to the storage of oxidizing equivalents in the oxygen evolving complex which comprises a cluster of four manganese ions and a redox-active tyrosine  $Y_Z$ . A mechanism invoking  $Y_Z^{\bullet}$ -mediated hydrogen atom abstraction from substrate water bound to the metal cluster has been proposed.<sup>2</sup> Four equivalents are needed before two molecules of water can be oxidized and molecular oxygen released. The intermediate states in the catalytic cycle are called the  $S_n$  states where  $n$  varies from 0 to 4 and denotes the overall oxidation state of the oxygen evolving complex.<sup>3</sup>

In the  $S_2$  state, the manganese cluster has an effective spin  $S = 1/2$  and exhibits an EPR signal known as the multiline signal.<sup>4</sup> Two inorganic cofactors,  $Ca^{2+}$  and  $Cl^-$ , are required for the enzyme to function normally. In preparations depleted of either of these cofactors water oxidation is inhibited.<sup>5</sup> In several of these depleted preparations the usual  $S_2$  to  $S_3$  transition is blocked, and illumination at 273 K results in the accumulation of a characteristic state. This state exhibits a broad split EPR signal arising from the magnetic interaction between an organic radical and the paramagnetic manganese cluster in a formal  $S_2$  state.<sup>6</sup> This state, sometimes referred to as a modified  $S_3$  state or  $S_2rad^{\bullet}$  state, was first reported in PS II preparations which were depleted of the calcium cofactor.<sup>6</sup>

Addition of high concentrations of acetate to a sample also inhibits PS II and allows the trapping of the broad split EPR signal assumed to arise from the same state.<sup>7</sup> Acetate is supposed to inhibit oxygen evolution by replacing the chloride cofactor.<sup>8</sup> The width of the splitting which relates to the strength of the

magnetic interaction varies between different types of preparations, ranging from about 9 mT to 23 mT.<sup>6,7,9</sup> The nature of the radical involved in the interaction has been under debate for a long time. There was agreement that the radical arose from an amino acid residue, either histidine or tyrosine.<sup>5(a),10–12</sup> By using electron spin–echo envelope modulation in conjunction with specifically  $^2H$ -labeled tyrosine in acetate-treated cyanobacteria PS II mutants the radical was identified as being  $Y_Z^{\bullet}$ .<sup>13</sup> The state in which it interacts with the manganese cluster is now referred to as  $S_2Y_Z^{\bullet}$ . In the native oxygen evolving system it is not possible to trap  $Y_Z^{\bullet}$  in the presence of the metal cluster because of the rapid reduction of the radical by the metal center.

A number of EPR studies and simulations have been done on this signal in part to determine the nature of the coupling. In calcium-depleted preparations, Boussac and co-workers simulated the EPR split signal assuming a weak exchange interaction between the metal cluster and the radical.<sup>10</sup> In the same way, MacLachlan and co-workers simulated the signal arising from calcium-depleted material as well as sodium acetate, calcium acetate, and ammonium chloride treated samples.<sup>14</sup> The spectral features for all of the different types of preparations could be simulated with a weak exchange interaction between the two species. Britt and co-workers simulated electron magnetic resonance data by modeling the interaction as dipolar coupling<sup>12,15</sup> (and assuming an  $S = 1$  state for the cluster in ref 12). On the basis of new  $^{55}Mn$  ENDOR data they published new simulations with dominant exchange interaction between two  $S = 1/2$  spins.<sup>1</sup> Other recent simulations<sup>17,18</sup> based on a model including both dipolar and exchange terms for the signal obtained in acetate-treated preparations showed that the interaction was predominantly of the exchange type with an antiferromagnetic coupling of  $-800$  to  $-850$  MHz and a dipole–dipole contribution of  $-140$  to  $-170$  MHz.

\* Corresponding author. E-mail: sun@ozias.saclay.cea.fr.



In this work, the magnetic interaction between the two species was further studied by using high-field EPR spectroscopy. The spectra of the coupled system were obtained at several frequencies in the range 95–285 GHz for acetate-treated PS II samples as well as Ca-depleted preparations, and the results were simulated and analyzed along with the 9 GHz data. In particular, it will be shown that the use of very high frequency allows the direct determination of the sign of the exchange interaction (ferromagnetic or antiferromagnetic interaction).

## Experimental Section

**Sample Preparation.** All biochemical preparations were performed on ice under dim green light. Photosystem II membranes were prepared with the procedure described previously.<sup>19</sup> The preparations were frozen at a chlorophyll concentration of about 8 mg<sub>Chl</sub>/mL in SMN buffer (sucrose 0.4 M, MES 50 mM, pH 6.0, NaCl 15 mM) and stored at –80 °C until used. Photosystem II reaction center cores were prepared by following the method developed by Mishra and Ghanotakis<sup>20</sup> except for the following modifications (Ghanotakis, personal communication). After incubation with octyl- $\beta$ -D-thiogluco-*pyranoside* detergent the mixture was directly diluted in a 2:1 ratio with SMN buffer containing 30 mM MgCl<sub>2</sub> and further incubated for 5 min in the dark. The preparation was centrifuged at 20 000 rpm for 30 min. The supernatant was diluted in a 2:1 ratio with MN buffer (MES 50 mM, pH 6.0, NaCl 15 mM) and the cores pelleted by 40 min centrifugation at 20 000 rpm.

Acetate treatment was carried out by washing the preparation twice with SM buffer pH 5.5 containing 500 mM acetate and 100 mM calcium. In the case of cores, the treatment was done directly after the preparation. One washing was sufficient to induce the maximum S<sub>2</sub>YZ\* signal in these more resolved preparations. After acetate treatment, samples were put directly in calibrated quartz EPR tubes along with 1 mM PPBQ as an electron acceptor (PPBQ was added from a stock solution in DMSO).

Calcium depletion was carried out by diluting PS II with SMN buffer down to a concentration of 1 mg<sub>Chl</sub>/mL and adding an equal volume of SMN buffer containing 4 M of sodium chloride. The resulting mixture was incubated for 20 min under room light. EDTA was added to a final concentration of 1 mM and the solution further incubated in the dark for 5 min then centrifuged at 20 000 rpm for 20 min. The pellet was washed twice in SMN buffer.

Trapping of the S<sub>2</sub>YZ\* state was performed by illuminating the sample at 273 K for 10 s followed by 15 s of additional illumination as the temperature was lowered to about 180 K in an ethanol bath cooled with liquid nitrogen. Dark adaptation to allow the decay of the S<sub>2</sub>YZ\* state was done by incubating the sample at 193 K in complete darkness for 48 h. All samples were controlled with 9 GHz EPR for the presence of the S<sub>2</sub>YZ\* signal and its complete disappearance upon dark adaptation.

**EPR Spectroscopy.** 9 GHz EPR spectra were recorded with a TE<sub>102</sub> mode cavity at liquid helium temperatures on a Bruker ESR 200 spectrometer equipped with a liquid helium continuous flow cryostat and transfer line from Oxford Instruments. The microwave frequency was measured with a Hewlett-Packard 5350B frequency counter connected to the microwave bridge.

At 95 GHz and higher frequencies, EPR spectra were recorded on a lab-built transmission spectrometer whose principles are similar to those described by Muller and co-workers.<sup>21</sup> In this case, however, a Gunn diode microwave source capable of generating a maximum output power of 90 mW over a 90–100 GHz frequency range was used as the fundamental

microwave source. The frequency was measured by using a frequency counter (EIP Microwave Inc., Milpitas, CA) with a better than 1 kHz accuracy. In conjunction with the Gunn oscillator, a frequency doubler and a frequency tripler (Radio-metric Physics, Menkenheim, Germany) were used to work in the 180–200 GHz and 270–300 GHz frequency ranges, respectively. For simplicity in the text, we refer to the different bands as 9, 95, 190 and 285 GHz rather than the exact frequency. The signal was detected by using an In–Sb bolometer (QMC Instruments Ltd., London, England) in conjunction with a lock-in amplifier (SRS, Sunnyvale, CA) and field modulation. The amplitude of the modulation field was calibrated by using a standard sample. The magnetic field was generated by using a superconducting 10.5 T magnet (Oxford Instruments, Oxon, England). The value of the magnetic field was obtained from the magnet power supply which has a manufacturer specified accuracy of  $\pm 0.05$  mT. Sample temperature regulation was achieved by using a built-in helium flow cryostat.

**Spectral Simulations.** Calculations were based on a spin-pair model by using the Hamiltonian of eq 1 (see following section). The powder spectra were obtained by calculating the resonant field for 100 000 random orientations of the applied magnetic field with respect to the *g*-axes frames and summing the results with their respective transition probability. The resulting orientation integrated spectrum was convoluted with a derivative Gaussian line shape with a suitable line width. The calculated spectrum was scaled to the experimental spectrum by using a scaling factor obtained from a linear fit of 10 to 20 data points. Variable parameters were estimated by minimizing the root-mean-square (rms) difference between the calculated and the experimental spectra. Nonlinear minimization was achieved by using standard simplex and conjugate gradient procedures.<sup>22</sup> The region containing the tyrosyl D radical signal was excluded from the rms calculation. It did not contribute to the minimization. All calculations were performed on a DEC Alphastation 250 (Maynard, MA) using local programs written in Fortran-77.

## Theory

The theory of spin coupled systems has been discussed in detail.<sup>23</sup> In the following, we review the salient aspects of the problem involving a tyrosyl radical coupled to a four-manganese cluster with emphasis on the application of high magnetic fields. The spin Hamiltonian for such a coupled system is given by

$$\hat{H} = \beta \vec{B}_0 \hat{g}_{\text{Tyr}} \hat{S}_{\text{Tyr}} + \beta \vec{B}_0 \hat{g}_{\text{Mn}} \hat{S}_{\text{Mn}} + \sum_{i=1}^4 \hat{I}_i \hat{A}_i \hat{S}_{\text{Mn}} + \hat{S}_{\text{Tyr}} \cdot \hat{C} \cdot \hat{S}_{\text{Mn}} \quad (1)$$

where the spin parameters  $g_{\text{Tyr}}$ ,  $g_{\text{Mn}}$ ,  $A_i$  and  $C$  are tensors and  $S$  and  $I$  are vector spin operators. The manganese cluster is in fact described by effective spin parameters and operators that describe the spin- $1/2$  ground state. The hyperfine term for the tyrosyl radical is neglected because the coupling constants<sup>24</sup> are considerably less than the line width of the signals studied. Each of the Zeeman terms, the first two terms of Eq. 1, are on the order of 3 (at 3.5 T) to 30 cm<sup>–1</sup> (at 10 T) compared to 0.010 cm<sup>–1</sup> for  $A$  and < 0.040 cm<sup>–1</sup> for  $C$ . An important consequence of this is that the number of terms introduced by the hyperfine and spin-spin coupling Hamiltonians is very much reduced. In addition, if it is assumed that the tensors are collinear, eq 1 greatly simplifies to

$$\hat{H} = g_{\text{Tyr}}\beta B_0\hat{S}_{\text{TyrZ}} + (g_{\text{Mn}}\beta B_0 + \sum_{i=1}^4 A_i\hat{I}_{iZ})\hat{S}_{\text{MnZ}} + C_{\text{ZZ}}\hat{S}_{\text{TyrZ}}\hat{S}_{\text{MnZ}} + C_{\pm}(\hat{S}_{\text{Tyr}+}\hat{S}_{\text{Mn}-} + \hat{S}_{\text{Tyr}-}\hat{S}_{\text{Mn}+}) \quad (2)$$

with

$$g = \sqrt{g^2 = g_X^2 \sin^2 \chi \cos^2 \psi + g_Y^2 \sin^2 \chi \sin^2 \psi + g_Z^2 \cos^2 \chi}$$

and

$$A_i = \left( \sqrt{a_{iX}^2 g_{\text{MnX}}^2 \sin^2 \chi \cos^2 \psi + a_{iY}^2 g_{\text{MnY}}^2 \sin^2 \chi \sin^2 \psi + a_{iZ}^2 g_{\text{MnZ}}^2 \cos^2 \chi} \right) / g_{\text{Mn}}$$

All of the spin parameters are scalar quantities.  $\chi$  is the angle between the magnetic field and the  $g_Z$  axis and  $\psi$  is the angle between the projection of the magnetic field on the ( $g_X$ ,  $g_Y$ ) plane and the  $g_X$  axis. This Hamiltonian can be readily solved analytically. The results describe a four-level system, each level of which is further divided into 1296 hyperfine sublevels. The lowest energy manifold is that of the unperturbed  $|\beta\beta M\rangle$  electronic spin state while the highest is that of the unperturbed  $|\alpha\alpha M\rangle$ . The inner two wavefunctions and their energies depend on the parameter  $\Omega$  defined by  $\sqrt{\delta^2 + 4C_{\pm}^2}$  where  $\delta = g_{\text{Tyr}}\beta B_0 - (g_{\text{Mn}}\beta B_0 + m_A)$  and  $m_A = \sum_{i=5/2}^{5/2} \sum_{i=1}^4 m_i A_i$ . The energies are given by  $(-C_{\pm} \pm 2\Omega)/4$ . The wavefunctions are of the form  $u|\alpha\beta M\rangle + v|\beta\alpha M\rangle$  where  $u$  and  $v$  are trigonometric coefficients determined by the ratio of  $\delta$  and  $\Omega$  and  $M$  describes the hyperfine states. For a single orientation of the magnetic field with respect to the common tensor axis system, the wavefunctions and energies will vary from spin-pair to spin-pair due to their dependence on the hyperfine states. This effect is not negligible. Even at 10 T, the magnitude of  $|m_A|$  is comparable to the anisotropy in the Zeeman interaction and can dominate  $\delta$ . As will be seen, it is also comparable to the coupling constants. Hence, the normal singlet–triplet nomenclature is not particularly useful.

An aspect of the four-level problem, especially relevant to HF-EPR, is the thermal population of the four spin states. For an applied field of 10 T, the energies of the allowed transitions from the lowest spin state are about 285 GHz. The corresponding temperature ( $h\nu/k$ ) is 14 K. Therefore, for experiments carried out at 4 K, only the  $|\beta\beta\rangle$  state will be significantly populated. Hence, only two of the four allowed transitions will be observable, one attributable to the metal and the other to the radical in the absence of interaction. The energies of these transitions are respectively

$$\Delta E_{24} = \frac{1}{2} (g_{\text{Tyr}}\beta B_0 + (g_{\text{Mn}}\beta B_0 + m_A) + \Omega - C_{\text{ZZ}}) \quad (3)$$

$$\Delta E_{34} = \frac{1}{2} (g_{\text{Tyr}}\beta B_0 + (g_{\text{Mn}}\beta B_0 + m_A) - \Omega - C_{\text{ZZ}}) \quad (4)$$

In the absence of spin coupling energies, the transition energies reduce to  $g_{\text{Tyr}}\beta B_0$  and  $g_{\text{Mn}}\beta B_0 + m_A$ , respectively. The sign of  $C_{\text{ZZ}}$  will determine whether the transition energy lies above or below the transition energies corresponding to the uncoupled spins system (see Scheme 1). Hence, a straightforward temperature dependence study will yield the sign of the coupling constant.

Up to this point, we have not specified the nature of the spin coupling. In this study we have chosen the simplest model. The isotropic component of the coupling  $C$  is attributed to Heisen-

berg exchange  $J$ . The anisotropic component is modeled by an axial dipolar coupling  $D$ .<sup>25</sup> It is important to note that the radical is coupled to four metal centers, and this has important consequences as pointed out by Bertrand et al.<sup>26</sup> The summation over the four couplings can be reduced to a single effective coupling in the following manner:

$$\hat{H}_{\text{EX}} = -\sum_{i=1}^4 J_i \hat{S}_{\text{Mni}} \cdot \hat{S}_{\text{Tyr}} = -\left(\sum_{i=1}^4 K_i J_i\right) \hat{S}_{\text{Mn}} \cdot \hat{S}_{\text{Tyr}} = -J \hat{S}_{\text{Mn}} \cdot \hat{S}_{\text{Tyr}} \quad (5)$$

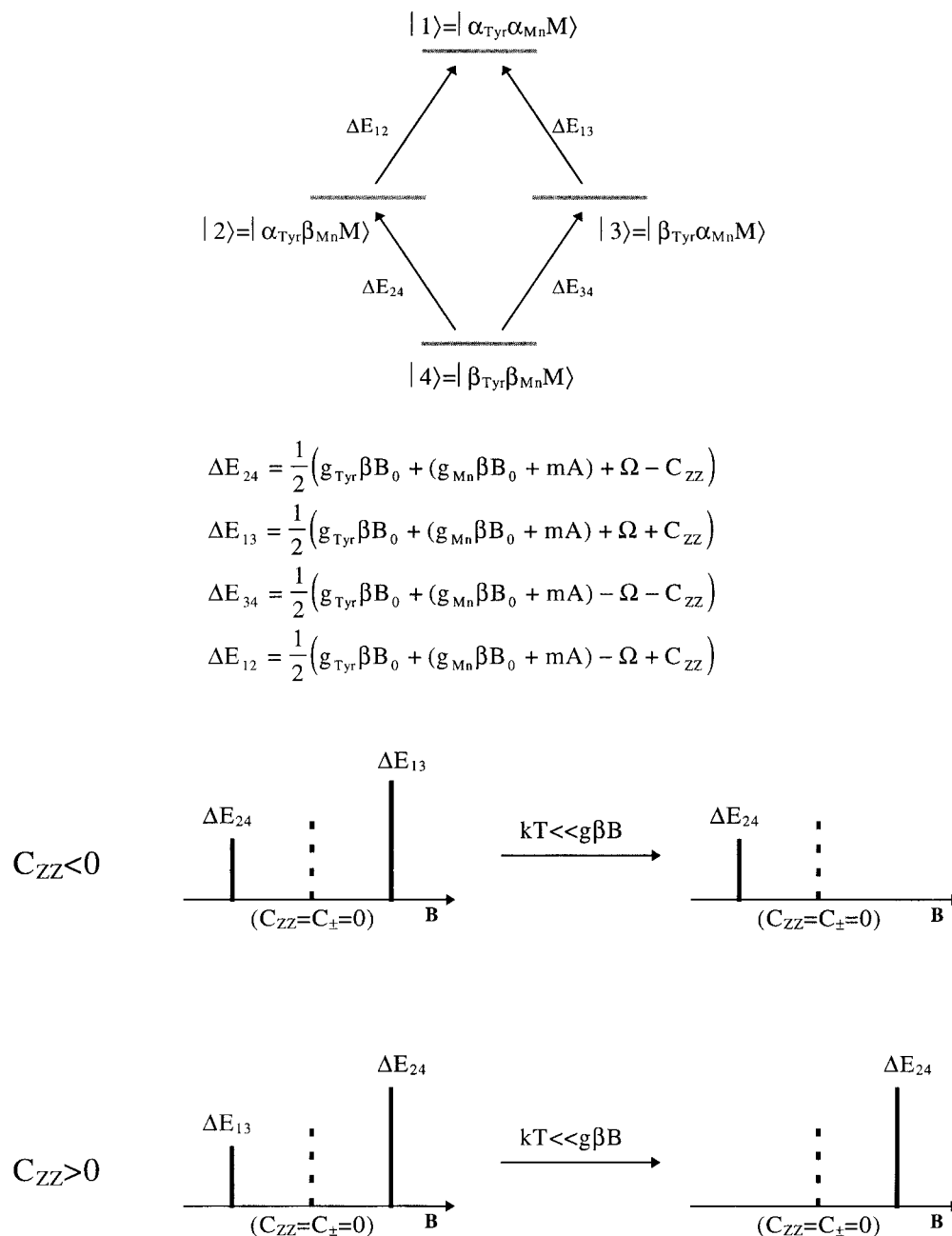
where  $K_i$  are weighting coefficients derived from the Wigner–Eckart theorem. Although the use of a single coupling constant greatly simplifies the problem, the sign of the effective constant no longer carries any physical meaning unless the  $K_i$  coefficients are known. Even when all four intrinsic couplings are antiferromagnetic (i.e., negative) the effective coupling can, in fact, be positive depending on the values of  $K_i$ . Moreover, the same arguments can also be applied to dipolar coupling.<sup>26,27</sup>

Finally, we point out an approximation based on a physical interpretation of eq 2 which reduces the time required to calculate a spectrum. The tyrosyl radical experiences the magnetic field due to magnetic moment of the manganese cluster. This moment is largely determined by the applied magnetic field, but is modified by the internal hyperfine couplings within the cluster. The hyperfine contribution is due to four anisotropic hyperfine interactions arising from four spin-5/2 nuclei. A suitable approximation of the hyperfine contribution of the manganese cluster is a simple binomial distribution, the breadth of which matches the multiline signal. Under this approximation, the multiline structure of the metal center will be lost. However, since the hyperfine interactions do not directly affect spin states of the radical, the calculated position and overall line shape of the tyrosyl radical portion of the spectrum will be unaffected compared to a complete calculation. Such an approximation has practical advantage in that the time required to calculate a spectrum is reduced since the summation over hyperfine states (1296 calculations) is replaced by a fixed function (<250 calculations).

## Results

**Position and Line Shape of the  $S_2Y_Z^*$  Signal.** Figures 1 and 2 show the EPR spectra obtained for the Ca-depleted and acetate-treated PS II membrane preparations respectively in which the  $S_2Y_Z^*$  state was trapped. In all cases, the dark stable tyrosyl radical  $Y_D^*$  gives a strong EPR signal that overlaps with the signals studied in this paper. In the Ca-depleted samples, the 9 GHz spectrum shows the signal split by 14.5 mT peak to trough. In acetate-treated membranes, the 9 GHz spectrum shows two major features split by 23 mT accompanied by two satellite peaks split by 44 mT and an underlying multiline signal. These correspond to the usual spectra reported for these preparations. The other spectra in the figures show the high-field spectra obtained on the same sample.

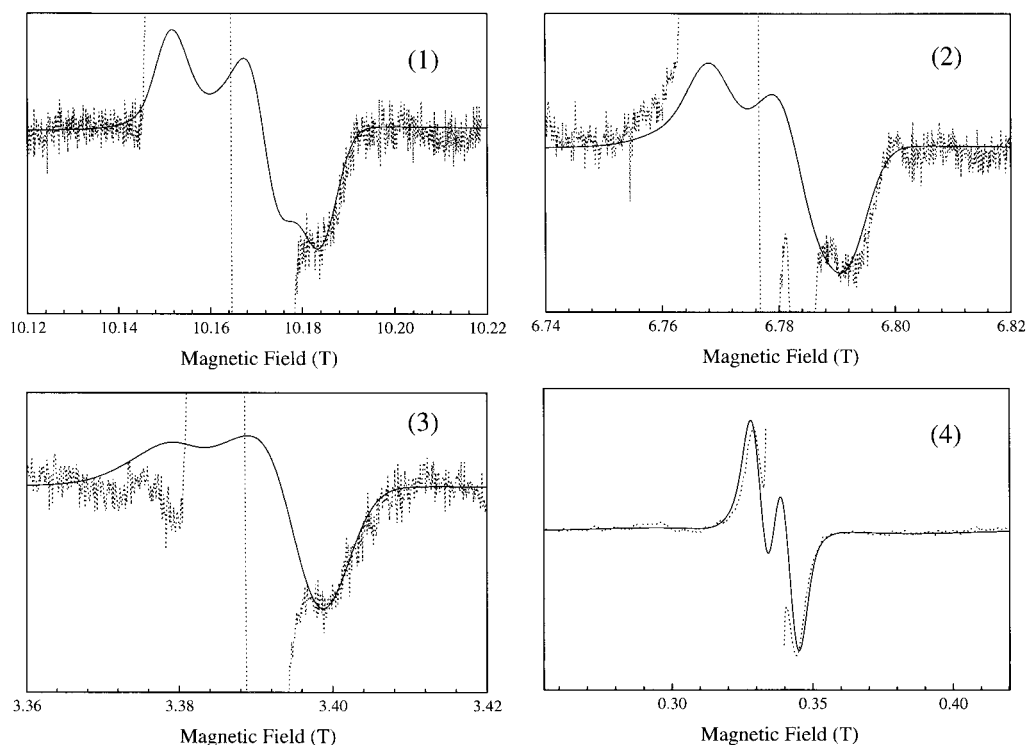
For the Ca-depleted sample, at 285 GHz a single broad feature appears centered about 9 mT upfield from the  $Y_D^*$   $g_z$  edge. At 190 and 95 GHz a similar signal is observed upfield from the  $Y_D^*$  signal. Downfield from the  $Y_D^*$  signal, there appears to be additional features just above the noise level. The spectra at high field for the acetate-treated sample are strikingly different from the corresponding spectra in Ca-depleted preparations. Most of the signal appears downfield from the  $Y_D^*$  signal. At 285 GHz, the main broad feature is centered about 20 mT from the  $g_x$  edge of the  $Y_D^*$  signal on the low field side. At 190 GHz

**SCHEME 1. Stick Spectra for the Coupled System Showing the Position of the Transitions Depending on the Sign of the Interaction and the Effect of the Boltzmann Distribution<sup>a</sup>**

<sup>a</sup> Only the two transitions corresponding predominantly to the tyrosyl radical are represented. The same analysis applies to the other two allowed transitions not shown.

two peaks can be seen centered about 20 and 10 mT from the  $Y_D^\bullet$   $g_x$  edge on the low field side. A third peak is visible 9 mT upfield from the  $g_z$  edge of the  $Y_D^\bullet$  signal. At 95 GHz, a broad signal appears on each side of the  $Y_D^\bullet$  spectrum. Three of the six sharp lines from Mn(II) are also observed in this spectrum. The Mn(II) signal is absent at 190 and 285 GHz due to thermal depopulation at the temperature used to record the spectra. The 9 and 285 GHz EPR spectra of  $S_2Y_Z^\bullet$  in acetate-treated reaction center cores are shown in Figure 3. For this preparation the splitting between the main features of the  $S_2Y_Z^\bullet$  signal at 9 GHz is 21 mT, narrower than in membranes and reflecting a somewhat weaker interaction. At 285 GHz, the signal visible on the low-field side of the  $Y_D^\bullet$  signal is centered about 15 mT from the  $g_x$  edge of the  $Y_D^\bullet$  signal (Figure 3, right spectrum), in closer proximity than in membranes (Figure 2, spectrum 1).

All of these features reproducibly appeared in the high-field spectra for different samples of each preparation exhibiting the well-known "split signal" at 9 GHz. Upon dark adaptation at 193 K (see Experimental Section) the features completely disappeared and it was possible to reinduce them by reilluminating the sample at 273 K. We attribute these features to the signal arising from the magnetic interaction between the  $Y_Z^\bullet$  radical and the manganese cluster. The field position and the extent of the  $S_2Y_Z^\bullet$  signal were reproducible for several samples of a given type of preparation. Possible contaminating signals can be readily distinguishable by their  $g$ -values which can be resolved by high-field EPR. We observed no evidence of chlorophyll signals. They are narrow even at high fields and occupy the region between 2.0022 and 2.0035. No signals from cytochrome  $b_{559}$  are expected in the magnetic field regions of



**Figure 1.** EPR spectra of the  $S_2YZ^\bullet$  state in Ca-depleted PS II membranes at different frequencies. Experimental spectra are represented by dotted lines. Simulated spectra are superimposed as solid lines. Experimental conditions: (1) microwave frequency  $\nu_{mw} = 285.1383$  GHz, modulation amplitude 2 mT, modulation frequency 3332 Hz, temperature  $T$  4.2 K, time constant 300 ms; (2) microwave frequency  $\nu_{mw} = 190.1634$  GHz, modulation amplitude 1.5 mT, modulation frequency 3332 Hz,  $T$  4.2 K, time constant 1 s; (3) microwave frequency  $\nu_{mw} = 95.0315$  GHz, modulation amplitude 2 mT, modulation frequency 3332 Hz,  $T$  4.2 K, time constant 300 ms; (4) microwave frequency  $\nu_{mw} = 9.43305$  GHz, modulation amplitude 1.5 mT, modulation frequency 100 kHz,  $T$  10 K, time constant 20 ms. For simulation parameters see text and Table 1.

interest. The details of the line shape of the  $S_2YZ^\bullet$  signal could, however, be affected by the distortion of the baseline due to microwave power saturation of the  $Y_D^\bullet$  signal (see for example Figure 4 in the case of the acetate-treated sample).  $Y_D^\bullet$  was found to saturate more readily than the  $S_2YZ^\bullet$  state. The saturation properties (and therefore the distortion) of the  $Y_D^\bullet$  signal depends on its interactions with the different paramagnetic cofactors present in the sample.<sup>28</sup> As a consequence, it was not possible to obtain light minus dark-adapted difference spectra because the line shape of  $Y_D^\bullet$  is different for the two states of the samples. Figure 4 shows two examples of full scale spectra: the 190 GHz EPR spectra from acetate-treated membranes and the 285 GHz EPR spectra from Ca-depleted preparations after illumination to trap  $S_2YZ^\bullet$  and after dark-adaptation. The spectral features attributable to  $S_2YZ^\bullet$  are clearly distinguishable even on this scale.

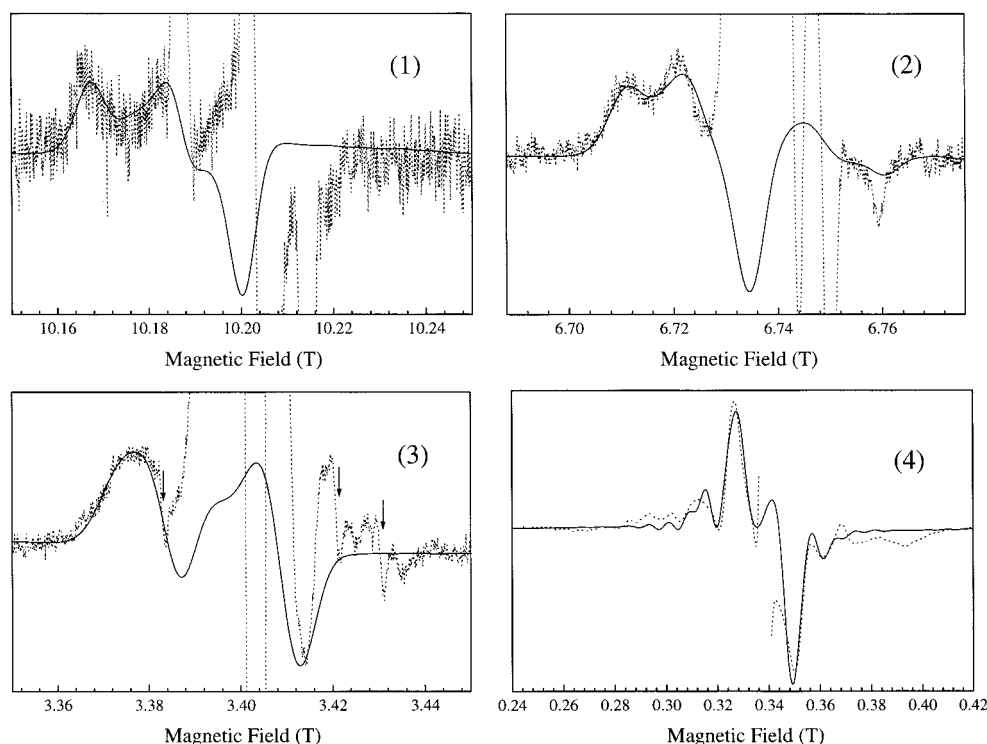
**Determination of the Coupling Parameters.** To estimate quantitatively the coupling parameters, we simulated the experimental spectra. The  $g$ -values for the tyrosyl radical were taken from 285 GHz EPR spectra of  $Y_D^\bullet$ <sup>29</sup> and fixed. We assume no change in the  $g$ -values of the radical, although the proximity of the manganese cluster could modify them through electrostatic effects.<sup>30</sup> The  $g$ -values and the hyperfine couplings for the manganese cluster are not known accurately. As a starting point, the hyperfine interaction was modeled by a binomial distribution function (see Theory). This function was chosen to match the shape and extent of the multiline signal observed in the  $S_2$  state of untreated preparations. Simulations using this approximation were nearly identical to those calculated by using the full hyperfine Hamiltonian. This demonstrated that the portions of the simulated spectra which are predominantly from the radical were insensitive to the details of the hyperfine

couplings. As expected the  $g$ -values of the cluster had a much greater effect on the simulated spectra at high field (see next section). However, we started by keeping them constant and the adjustable parameters were  $J$ ,  $D$ , and the two angles  $\theta$  and  $\varphi$  defining the orientation of the axis joining the two dipoles in the  $g$ -axes frame. At 9 GHz the angles  $\theta$  and  $\varphi$  have negligible effect on the overall line shape of the spectra but their impact on the simulated spectra increases with the frequency. The angles were determined by visual inspection of the simulated spectra at high frequency. The 190 GHz spectra obtained in acetate-treated samples was particularly useful for this work because it exhibits visible features arising from the splitting of all three  $g$  components of the tyrosyl signal (see Figure 4, right spectra).

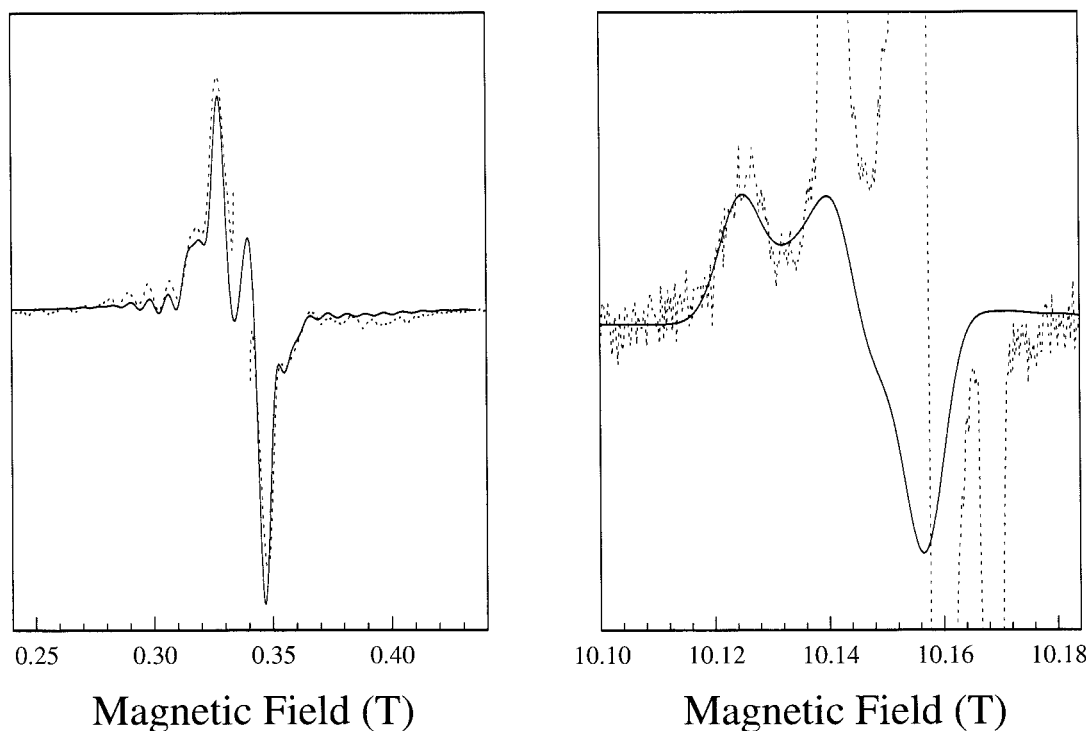
The best fits obtained are shown in Figures 1, 2, and 3 along with the experimental spectra. In Ca-depleted preparations, the values for the couplings are  $J = -0.42$  GHz and  $D = -0.1$  GHz. The negative sign of  $J$  indicates that the tyrosyl radical and the manganese cluster are antiferromagnetically coupled. In acetate-treated PS II membranes, the values obtained are  $J = 0.82$  GHz and  $D = -0.12$  GHz. The two spins in this case are ferromagnetically coupled. As mentioned above for acetate-treated samples, the coupling is weaker in reaction center cores compare to membranes. Nonetheless, the high field data show that the coupling remains ferromagnetic in cores. The values obtained for cores are  $J = 0.66$  GHz and  $D = -0.11$  GHz.

In acetate-treated preparations variations in the splitting of the signal are observed at 9 GHz depending on whether the treatment is performed on cores or membranes. These variations are also observed at high field. In the case of Ca-depleted preparations, different size splittings are also observed for the signal at 9 GHz depending on the exact protocol used to prepare





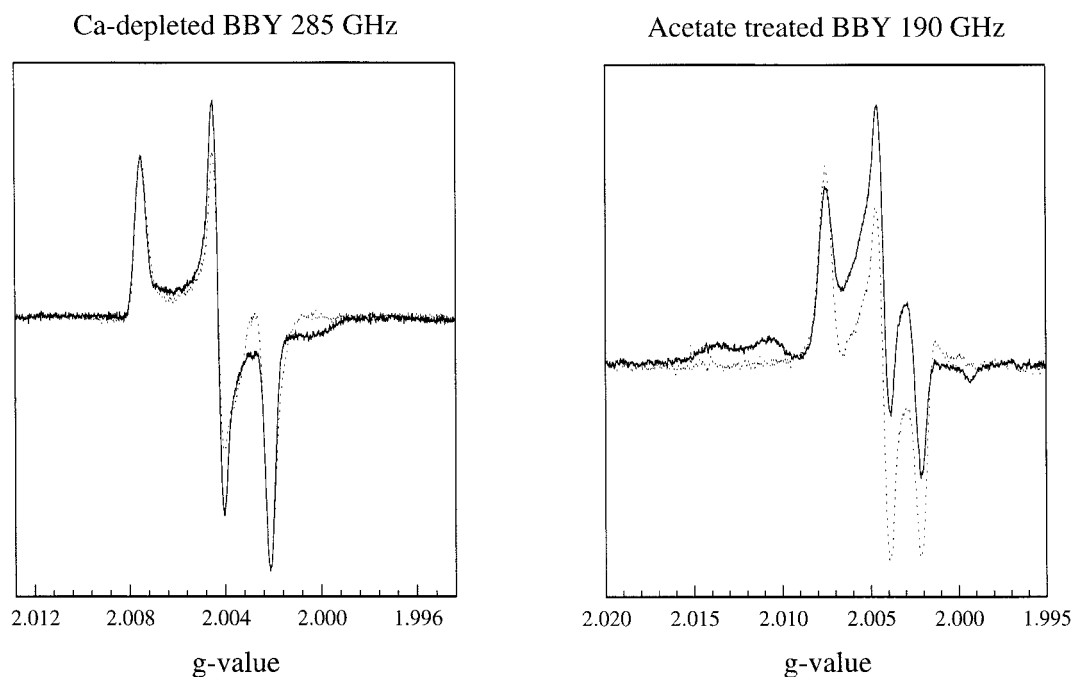
**Figure 2.** EPR spectra of the  $S_2YZ^*$  state in acetate-treated PS II membranes at different frequencies. Experimental spectra are represented by dotted lines. Simulated spectra are superimposed as solid lines. Experimental conditions: (1) microwave frequency  $\nu_{mw} = 286.2321$  GHz, modulation amplitude 2 mT, modulation frequency 3318 Hz,  $T$  2.5 K, time constant 300 ms; (2) microwave frequency  $\nu_{mw} = 189.1418$  GHz; modulation amplitude 2 mT; modulation frequency 3318 Hz,  $T$  3 K; time constant 1 s; (3) microwave frequency  $\nu_{mw} = 95.3559$  GHz, modulation amplitude 1.5 mT, modulation frequency 3332 Hz,  $T$  3 K, time constant 1 s, the sharp features indicated by arrows in the experimental spectrum are three of the six hyperfine lines from contaminating Mn(II); (4) microwave frequency  $\nu_{mw} = 9.4677$  GHz, modulation amplitude 1.27 mT, modulation frequency 100 kHz,  $T$  10 K, time constant 41 ms. For simulation parameters see text and Table 1.



**Figure 3.** EPR spectra of the  $S_2YZ^*$  state in acetate-treated reaction center cores at X band (left panel) and 285 GHz (right panel). Experimental spectra are shown as dotted lines. Simulated spectra are superimposed as solid lines. Experimental conditions: (left panel) microwave frequency  $\nu_{mw} = 9.464$  GHz, modulation amplitude 2 mT, modulation frequency 100 kHz,  $T$  7 K, time constant 80 ms; (right panel) microwave frequency  $\nu_{mw} = 284.9361$  GHz, modulation amplitude 2 mT, modulation frequency 3318 Hz,  $T$  3.5 K, time constant 300 ms. For simulation parameters see text and Table 1.

the samples and on the presence or absence of the 17 and 23 kDa extrinsic polypeptides that bind on the donor side of the

protein. In this case, the variation of splitting at 9 GHz did not translate into an observable shift in the position of the broad



**Figure 4.** Two examples of full scale high-frequency EPR spectra in Ca-depleted and acetate-treated PS II membranes. Spectra shown as solid lines were recorded on samples in which the  $S_2Y_Z^*$  state was trapped; spectra shown as dotted lines were recorded on the same samples after dark adaptation. Experimental conditions: left panel, same as Figure 1 spectrum (1); right panel, same as Figure 2 spectrum (2).

**TABLE 1: Parameters Used in the Simulations of the EPR Signals**

Tyrosyl Radical			
$g_x = 2.0075$	$g_y = 2.0043$	$g_z = 2.0021$	
Manganese Cluster			
$g_x = 1.9967$	$g_y = 1.9955$	$g_z = 1.9600$	
Acetate-Treated Samples			
$a_{1x} = a_{1y} = 180$ MHz	$a_{2x} = 270$ MHz	$a_{3x} = 270$ MHz	$a_{4x} = 270$ MHz
$a_{1z} = 260$ MHz	$a_{2y} = a_{2z} = 210$ MHz	$a_{3y} = a_{3z} = 200$ MHz	$a_{4y} = a_{4z} = 230$ MHz
Ca-Depleted Samples			
$a_{1\text{iso}} = 420$ MHz	$a_{2\text{iso}} = 210$ MHz	$a_{3\text{iso}} = 148$ MHz	$a_{4\text{iso}} = 136$ MHz
Interaction			
Acetate-Treated PS II Membranes			
$J = 820$ MHz ( $\sigma_J = 40$ MHz)	$D = -120$ MHz		$\theta = 90^\circ; \varphi = 0^\circ$
Acetate-Treated Reaction Center Cores			
$J = 680$ MHz ( $\sigma_J = 40$ MHz)	$D = -110$ MHz		$\theta = 90^\circ; \varphi = 0^\circ$
Ca-Depleted PS II Membranes			
$J = -420$ MHz ( $\sigma_J = 150$ MHz)	$D = -100$ MHz		$\theta = 90^\circ; \varphi = 0^\circ$

signal at high field (data not shown). To obtain good fits at all frequencies for the Ca-depleted preparation it was necessary to use a distribution in the exchange coupling. The distribution was modeled by a Gaussian function with a full width of  $\sigma_J$  at half-height (see Table 1). Without distribution, the coupling constants determined by fitting the high-field spectra were too large to account for the 9 GHz spectrum of the Ca-depleted sample. The main effect of the distribution in the coupling observed in the simulated spectra was a narrowing of the peak-to-trough width of the signal at 9 GHz while the calculated high-field spectra were relatively unaffected. The position of the signal remained unchanged, and any changes in line shape were small. The values and distribution width for the coupling constants are given in Table 1. Finally, we note that parameters that we have obtained are also consistent with the 3 GHz EPR spectrum (of Ca-depleted material) (see Supporting Information).

**Effects of the  $g$ -Values and Hyperfine Coupling of the Metal Cluster.** The exact  $g$ -values for the cluster had a noticeable effect on the simulated spectra of the  $S_2Y_Z^*$  signal

for high magnetic fields. Data obtained at several frequencies in the range 9–285 GHz provided considerable constraints on the simulations. Hence it was possible to allow the  $g$ -values of the cluster to vary and to obtain those that fit best. The values are reported in Table 1. It is interesting to note that they are close to axial symmetry.

Because the magnitude of the hyperfine couplings for the metal cluster is on the same order as the coupling parameters between the radical and the cluster, it is important that the hyperfine term be included in order to accurately describe the  $S_2Y_Z^*$  state. At 95 GHz and higher frequencies, the hyperfine couplings for the metal center stay unresolved and contribute in part to the broadening of the spectra. At 9 GHz however, as in the case of acetate-treated preparations, the  $S_2Y_Z^*$  state exhibits an underlying multilined signal. By modeling the hyperfine term with a binomial distribution, the envelope of this multilined signal was obtained but the multilined structure was lost (see Supporting Information). To reproduce the details of the line shape, the full calculations using actual hyperfine

values were required. All of the simulations presented in this work used the full hyperfine calculation. The values used are given in Table 1. For calcium-depleted preparations, the hyperfine values were chosen to account for the dark stable multiline observed in the  $S_2$  state and taken from the literature.<sup>10</sup> In the case of the acetate-treated samples, we chose values to account for the underlying multiline signal present in the  $S_2Y_Z^*$  signal at 9 GHz. However, we note that this set of hyperfine values is not likely to be unique.

## Discussion

The high-field spectra were recorded at a temperature of 4.2 K or lower corresponding to a maximum Boltzmann energy  $kT$  of 87.5 GHz. Therefore for spectra recorded at high frequency, only the ground state will be significantly populated and the transitions arising from higher energy Zeeman states will not be observed or will give a signal of small amplitude (see Scheme 1). We were unable to observe the transitions that are predominantly from the metal cluster presumably due to insufficient sensitivity. The signal arising from the manganese cluster is very broad and therefore very small in amplitude. The signals we see correspond to transitions which belong predominantly to the radical. As shown in the theoretical section, the position of the signal with respect to the  $Y_D^*$  spectrum (which models the noninteracting tyrosyl radical signal) directly determines the sign of the interaction. Therefore it is clear from the high-field spectra that the sign of the coupling between the radical and the cluster must be opposite in acetate-treated and calcium-depleted preparations. Since the isotropic exchange interaction was found to dominate the dipolar interaction this means that the radical and the cluster are ferromagnetically coupled in acetate-treated preparations and antiferromagnetically coupled in calcium-depleted samples.

A previous study using 9 and 33 GHz EPR found the exchange coupling to be antiferromagnetic in acetate-treated PS II membranes.<sup>18</sup> In this work, the authors assign the sign of the coupling by looking at details in the simulations of a 9 GHz spectrum of the  $S_2Y_Z^*$  signal. In our work, the sign of the coupling is determined directly from the 190 and 285 GHz experimental spectra. At high field, the sign of the exchange coupling has a dramatic effect. Signals are either present or absent and it is very clear that any set of parameters which uses an antiferromagnetic coupling fails in simulating the high-field data for acetate-treated samples. Our parameters yield good simultaneous fits of the data taken at the four different frequencies we use, as well as the Q-band data presented in ref 18 (see Supporting Information for calculated spectra with positive and negative values for  $J$ ). This points to the strength of multifrequency high-field EPR over conventional-frequency EPR in characterizing the exchange coupling.

Although less common than antiferromagnetic coupling, cases of ferromagnetic coupling between a radical and a metallic center in a protein have been reported in the literature.<sup>31–33</sup> In cytochrome *c* peroxidase compound ES, a tryptophanyl radical is weakly coupled to an oxyferryl moiety. It has been shown<sup>31</sup> that the coupling is distributed and both ferromagnetic and antiferromagnetic components are present with  $J \approx 2.94$  GHz for one-third of the enzyme population and  $J \approx -1.47$  GHz for two-thirds of the enzyme population in the sample. The dual nature of the exchange coupling, ferromagnetic and antiferromagnetic, in the same given type of preparation has been explained by a bimodal conformational substate distribution (see below) of the protein in the frozen solution.<sup>31</sup> The difference in the sign of  $J$  in this case has been postulated to arise from

differences in orbital overlaps on the exchange path between the  $Trp^*$  radical and the heme due to distribution in the protein conformation. In PS II both ferromagnetic and antiferromagnetic couplings can also be observed but not simultaneously in a single sample. The sign of the coupling depends on the treatment of the sample.

In Ca-depleted samples, good simulations can be obtained for the three highest frequencies with a small distribution in  $J$ . At 9 GHz, however, the splitting obtained was too big compared to the experimental data and a rather large distribution was necessary to fit the data at all frequencies. The need for distribution has been routinely reported for simulations of coupled radical–metal center signal in protein.<sup>31,34–36</sup> The distribution in the exchange coupling is likely to reflect the distribution in protein conformation. In studies of protein conformational substates<sup>37,38</sup> the protein is modeled as a glass and a distribution of structural states (so-called substates) is used, each one being separated from the other by a small energy barrier. In solution, the interconversion between all of the substates is very fast and the protein conformation is the average of all the substates. As the temperature is lowered to trap the  $S_2Y_Z^*$  state, each protein is frozen in its own structural substate which can be different from its neighbors.

There are at least two possible explanations for the sign difference in the spin–spin coupling observed for the acetate- and calcium-treated samples. First, the differences in observed effective coupling constant may reflect differences in one or more of the four couplings between the radical and each manganese ion (eq 5). To understand better how this might arise, we consider a simple “dimer-of-dimers” model of the type recently analyzed by Blondin and co-workers.<sup>39</sup> In this model, the four-manganese cluster is characterized by three exchange couplings: one coupling between the metal ions for each dimer and a third between the two dimers. One of the dimers is composed of a Mn(III) and a Mn(IV) ion and the other two Mn(IV) ions. For a configuration where both dimers are antiferromagnetically coupled, the contribution from the two Mn(IV) dimer is zero and the effective coupling between a radical and such a cluster is given by  $J_{III} - 1/2J_{IV}$ . In this case, one possibility is that the spin coupling in one type of sample is characterized by a radical–Mn(III) coupling while in the other by a radical–Mn(IV) coupling. This naturally leads to a change in sign and magnitude of the effective coupling, even when the sign and magnitude of the intrinsic coupling remain constant.

An alternative possible source of the sign difference is that the  $K_i$  coefficients themselves have changed due to alterations in the electronic structure of the cluster. This possibility is interesting in light of the fact that the acetate-treated samples exhibit no multiline signal in the  $S_2$  state while a multiline signal is readily observed for Ca-depleted samples. The fact that an underlying multiline-type signal is observed in the acetate-treated sample upon formation of the  $S_2Y_Z^*$  state is further evidence that the electronic structure of the manganese cluster undergoes significant modification. If the structure of the manganese cluster is different in the two types of samples, it would seem reasonable that the individual intrinsic exchange couplings between the metal centers and the radical will also be different. Undoubtedly, there is insufficient information from our experiments to distinguish between any of these various possibilities. However, as the signs of the exchange couplings are different, this necessarily implies that the spin pairs that give rise to the split signal in Ca-depleted and acetate-treated samples are distinct. The differences must arise from modifications in either the structure of the manganese cluster or the electronic interactions

between the interacting spins or both. Hence, any attempts to compare the two systems must necessarily account for these differences.

One of the interesting aspects of studying coupled systems is the possibility of deriving a distance between the two interacting species from the dipolar part of the interaction.<sup>5a,14–18</sup> In these studies, as in the present work, the point dipole approximation was used. However, as discussed above, the dipolar coupling is also an effective parameter depending strongly on the electronic structure of the two interacting centers and therefore not necessarily axial. It has been pointed out by Fournel and co-workers<sup>36</sup> that in more detailed treatments taking this fact into account it is not possible to extract structural information due to the inability to separate exchange and dipolar terms. Hence, for PS II the distances obtained from the simulations are *effective spin–spin* distances. There is not enough information to calculate an accurate geometrical distance between the radical and the manganese cluster. However, the very need to consider local spin distributions implies that the two species must be in proximity. It is clear that the simple approach which we have taken in conjunction with multifrequency high-field EPR can be useful in characterizing large changes in the coupling which makes it possible to detect changes in the structure of the tyrosyl–manganese cluster pair.

## Conclusion

This study demonstrates the importance of using a multifrequency approach to analyze spin–spin coupling interactions, in particular high-field EPR. The application of high-field EPR enabled us to directly assign the sign of the spin–spin coupling. Using a simple spin coupling model, we simulated spectra obtained at four different frequencies to obtain good estimates of the coupling parameters and to verify the sign of the couplings. In the case of the calcium-depleted samples, this multifrequency approach also indicated the presence of distributed spin interactions. The details of the quantum mechanics leading to the observed distribution and sign difference are not completely understood. Future studies will need to focus on the importance of these differences and their structural and electronic implications for the tyrosyl–manganese cluster system.<sup>40</sup>

**Acknowledgment.** Moritz Knüpling is acknowledged for help in designing and building the high-field EPR spectrometer. We thank Anabella Ivancich for stimulating discussions. This research was supported by a grant from the Human Frontiers Science Organization (contract # RGO349) and by the E.U. through HCM grant FMRX-CT98-0214. P.D. acknowledges the CEA for a fellowship.

**Supporting Information Available:** Derivation of the energy levels and wave functions for two coupled  $S = 1/2$  spins with hyperfine coupling. 3 GHz spectrum of the  $S_2Y_Z^*$  state in Ca-depleted PS II preparation. Calculated spectra for acetate-treated samples comparing ferromagnetic and antiferromagnetic couplings. Comparison between simulated spectra calculated by using the full hyperfine term or by using a binomial distribution to account for the hyperfine term of the manganese cluster. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

## References and Notes

- (1) (a) Rutherford, A. W.; Zimmermann, J.-L.; Boussac, A. In *The Photosystems: Structure, Function and Molecular Biology*; Barber, J., Ed.; Elsevier: Amsterdam, 1992; Chapter 5. (b) Britt, R. D. In *Oxygenic Photosynthesis: The Light Reactions*; Ort, D. R., Yocum, C. F., Eds; Kluwer

- Academic Publishers: Dordrecht, 1996; pp 137–164. (c) Diner, B. A.; Babcock, G. T. In *Oxygenic Photosynthesis: The Light Reactions*; Ort, D. R.; Yocum, C. F., Eds; Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, 1996; pp 213–247.
- (2) (a) Hoganson, C. W.; Babcock, G. T. *Science* **1997**, *277*, 1953. (b) Tommos, C.; Babcock, G. T. *Acc. Chem. Res.* **1998**, *31*, 18.
- (3) Kok, B.; Forbush, B.; McGloin, M. *Photochem. Photobiol.* **1970**, *11*, 457.
- (4) Dismukes, G. C.; Siderer, Y. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1981**, *78*, 274.
- (5) (a) Rutherford, A. W.; Boussac, A. In *Research in Photosynthesis*; Murata, N., Ed; Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, 1992; Vol. II, pp 21–27. (b) Debus, R. J. *Biochim. Biophys. Acta* **1992**, *1102*, 269. (c) Coleman, W. J. *Photosynth. Res.* **1990**, *23*, 1. (d) Yocum, C. F. *Biochim. Biophys. Acta* **1991**, *1059*, 1.
- (6) Boussac, A.; Zimmermann, J.-L.; Rutherford, A. W. *Biochemistry* **1989**, *28*, 8984.
- (7) MacLachlan, D. J.; Nugent, J. H. A. *Biochemistry* **1993**, *32*, 9772.
- (8) (a) Sinclair, J. *Biochim. Biophys. Acta* **1984**, *764*, 247. (b) Sandusky, P. O.; Yocum, C. F. *Biochim. Biophys. Acta* **1986**, *849*, 85. (c) Gerken, S.; Dekker, J. P.; Schlodder, E.; Witt, H. T. *Biochim. Biophys. Acta* **1989**, *977*, 52. (d) Kühne, H.; Szalai, V. A.; Brudvig, G. W. *Biochemistry* **1999**, *38*, 6604.
- (9) (a) Boussac, A.; Sétif, P.; Rutherford, A. W. *Biochemistry* **1992**, *31*, 1224. (b) Andréasson, L. E.; Lindberg, K. *Biochim. Biophys. Acta* **1992**, *1100*, 177. (c) Ono, T.; Inoue, Y. *Biochim. Biophys. Acta* **1990**, *1020*, 269.
- (10) Boussac, A.; Zimmermann, J.-L.; Rutherford, A. W.; Lavergne, J. *Nature* **1990**, *347*, 303.
- (11) (a) Hallahan, B. J.; Nugent, J. H. A.; Warden, J. T.; Evans, M. C. W. *Biochemistry* **1992**, *31*, 4562. (b) Boussac, A.; Rutherford, A. W. *Biochemistry* **1992**, *31*, 7441.
- (12) Gilchrist, M. L.; Ball, J. A.; Randall, D. W.; Britt, R. D. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1995**, *92*, 9545.
- (13) Tang, X. S.; Randall, D. W.; Force, D. A.; Diner, B. A.; Britt, R. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7638.
- (14) MacLachlan, D. J.; Nugent, J. H. A.; Warden, J. T.; Evans, M. C. W. *Biochim. Biophys. Acta* **1994**, *1188*, 325.
- (15) Force, D. A.; Randall, D. W.; Britt, R. D. *Biochemistry* **1997**, *36*, 12062.
- (16) Peloquin, J. M.; Campbell, K. A.; Britt, R. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 6840.
- (17) Dorlet, P.; Di Valentin, M.; Babcock, G. T.; McCracken, J. L. *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 8239.
- (18) Lakshmi, K. V.; Eaton, S. S.; Eaton, G. R.; Frank, H. A.; Brudvig, G. W. *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 8327.
- (19) (a) Berthold, D. A.; Babcock, G. T.; Yocum, C. F. *FEBS Lett.* **1981**, *277*, 69. (b) Ghanotakis, D. F.; Topper, J.; Babcock, G. T.; Yocum, C. F. *Biochim. Biophys. Acta* **1984**, *767*, 524.
- (20) Mishra, R. K.; Ghanotakis, D. F. *Photosynth. Res.* **1994**, *42*, 37.
- (21) Muller, F.; Hopkins, M. A.; Coron, N.; Grynberg, M.; Brunel, L.; Martinez, G. *Rev. Sci. Instrum.* **1989**, *60*, 3681.
- (22) Press, W. H.; Flannery, B. P.; Teukolsky, S. A.; Vetterling, W. T. *Numerical Recipes*; Cambridge University Press: New York, 1986.
- (23) (a) Smith, T. D.; Pilbrow, J. R. *Coord. Chem. Rev.* **1974**, *13*, 173. (b) Eaton, S. S.; More, K. M.; Sawant, B. M.; Boymel, P. M.; Eaton, G. R. *J. Magn. Res.* **1983**, *52*, 435. (c) Hore, P. J. In *Advanced EPR: Applications in Biology and Biochemistry*; Hoff, A. J., Ed.; Elsevier: Amsterdam, 1989; Chapter 12.
- (24) Hoganson, C. W.; Babcock, G. T. *Biochemistry* **1988**, *27*, 5848.
- (25) The Heisenberg exchange Hamiltonian is given in eq 5. The coefficients  $C_{zz}$  and  $C_{\pm}$  expand as follow in function of  $J$  and  $D$ :  $C_{zz} = -J - 2D(\cos^2\Theta - 1/3)$  and  $C_{\pm} = -(J + D(\cos^2\Theta - 1/3))/2$  where  $\Theta$  is the angle between the magnetic field and the axis joining the two point dipoles.
- (26) Bertrand, P.; More, C.; Guigliarelli, B.; Fournel, A.; Bennet, B.; Howes, B. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 3078.
- (27) Bertrand, P.; Camensuli, P.; More, C.; Guigliarelli, B. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 1426.
- (28) Un, S.; Brunel, L.-C.; Brill, T.; Zimmermann, J.-L.; Rutherford, A. W. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1994**, *91*, 5262.
- (29) Un, S.; Tang, X.-S.; Diner, B. A. *Biochemistry* **1996**, *35*, 679.
- (30) Un, S.; Atta, M.; Fontecave, M.; Rutherford, A. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 10713.
- (31) Houseman, A. L. P.; Doan, P. E.; Goodin, D. B.; Hoffman, B. M. *Biochemistry* **1993**, *32*, 4430.
- (32) Benceky, M. J.; Frew, J. E.; Scowen, N.; Jones, P.; Hoffman, B. M. *Biochemistry* **1993**, *32*, 11929.
- (33) Patterson, W. R.; Poulos, T. L.; Goodin, D. B. *Biochemistry* **1995**, *34*, 4342.
- (34) Stevenson, R. C.; Dunham, W. R.; Sands, R. H.; Singer, T. P.; Beinert, H. *Biochim. Biophys. Acta* **1986**, *869*, 81.
- (35) Rutter, R.; Valentine, M.; Hendrich, M. P.; Hager, L. P.; Debrunner, P. G. *Biochemistry* **1983**, *22*, 4769.



- (36) Fournel, A.; Gambarelli, S.; Guigliarelli, B.; More, C.; Asso, M.; Chouteau, G.; Hille, R.; Bertrand, P. *J. Chem. Phys.* **1998**, *109*, 10905.
- (37) Frauenfelder, H.; Sligar, S. G.; Wolynes, P. G. *Science* **1991**, *254*, 1598.
- (38) Stein, D. In *Protein Structure: Molecular and Electronic Reactivity*; Springer-Verlag: New York, 1987; pp 85–93.
- (39) Blondin, G.; Davydov, R.; Philouze, C.; Charlot, M.-F.; Styring, S.; Åkermark, B.; Girerd, J.-J.; Boussac, A. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1997**, *21*, 4069.
- (40) A very recent 9 GHz EPR study of the  $S_2Yz^*$  state in oriented PS II membranes<sup>41</sup> appeared while this paper was under review. In this

orientation study, the starting parameters for the coupling between the radical and the metal cluster were taken from ref 18 in which the exchange coupling was taken to be antiferromagnetic on the basis of simulations of 9 GHz EPR data. In particular, the sign of the exchange coupling is referred to during the analysis to determine the angle  $\theta_D$  between the interspin vector and the normal to the membrane which is a key factor in the simulations. Our data show that the coupling in acetate-treated samples is in fact ferromagnetic and this may influence the simulations of oriented data and their resulting interpretation.

- (41) Lakshmi, K. V.; Eaton, S. S.; Eaton, G. R.; Brudvig G. W. *Biochemistry* **1999**, *38*, 12758.

# Orientation of the Tyrosyl D, Pheophytin Anion, and Semiquinone $Q_A^{\bullet-}$ Radicals in Photosystem II Determined by High-Field Electron Paramagnetic Resonance<sup>†</sup>

Pierre Dorlet, A. William Rutherford, and Sun Un\*

Section de Bioénergétique, Département de Biologie Cellulaire et Moléculaire, CNRS URA 2096, CEA Saclay, F-91191 Gif-sur-Yvette Cedex, France

Received January 31, 2000; Revised Manuscript Received April 20, 2000

**ABSTRACT:** The radical forms of two cofactors and an amino acid in the photosystem II (PS II) reaction center were studied by using high-field EPR both in frozen solution and in oriented multilayers. Their orientation with respect to the membrane was determined by using one-dimensionally oriented samples. The ring plane of the stable tyrosyl radical,  $Y_D^{\bullet}$ , makes an angle of  $64^\circ \pm 5^\circ$  with the membrane plane, and the C–O direction is tilted by  $72^\circ \pm 5^\circ$  in the plane of the radical compared to the membrane plane. The semiquinone,  $Q_A^{\bullet-}$ , generated by chemical reduction in samples lacking the non-heme iron, has its ring plane at an angle of  $72^\circ \pm 5^\circ$  to the membrane plane, and the O–O axis is tilted by  $21^\circ \pm 5^\circ$  in the plane of the quinone compared to the membrane plane. This orientation is similar to that of  $Q_A^{\bullet-}$  in purple bacteria reaction centers except for the tilt angle which is slightly bigger. The pheophytin anion was generated by photoaccumulation under reducing conditions. Its ring plane is almost perpendicular to the membrane with an angle of  $70^\circ \pm 5^\circ$  with respect to the membrane plane. This is very similar to the orientation of the pheophytin in purple bacteria reaction centers. The position of the  $g$  tensor with respect to the molecule is tentatively assigned for the anion radical on the basis of this comparison. In this work, the treatment of orientation data from EPR spectroscopy applied to one-dimensionally oriented multilayers is examined in detail, and improvements over previous approaches are given.

Photosystem II (PS II)<sup>1</sup> is a large membrane protein composed of several intrinsic and extrinsic subunits. It catalyzes the oxidation of water into dioxygen and the reduction of quinones (1–4). These processes result from a charge separation initiated by photoexcitation of a chlorophyll species,  $P_{680}$ , which forms a highly reducing singlet state. An electron is then given to a pheophytin  $a$  molecule and subsequently transferred to a plastoquinone molecule,  $Q_A$ , forming the semiquinone radical, while the  $P_{680}^+$  species is reduced by a redox-active tyrosine,  $Y_Z$ .

Under normal conditions, the semiquinone radical is magnetically coupled to a high-spin non-heme  $Fe^{2+}$  (5–7). It is, however, possible to decouple the two species by a range of different biochemical methods: pH 11 treatment (8), conversion of the  $Fe^{2+}$  to the low-spin  $S = 0$  state by cyanide treatment (9), substitution by  $Zn^{2+}$  (10), and removal of the non-heme iron (11). In these treated preparations, the addition of a chemical reductant in the dark allows the direct

observation of the semiquinone radical EPR signal. Under strongly reducing conditions, it is possible to doubly reduce the quinone  $Q_A$  to the quinol form by continuous illumination above 273 K (12). It is then possible to photoaccumulate the pheophytin anion radical (13–15). In the absence of chemical reductant, another radical, the stable tyrosyl radical,  $Y_D^{\bullet}$ , is present in the dark. This species plays a role in electron transfer reactions under certain conditions and is symmetrically related (16) to the kinetically competent tyrosyl radical,  $Y_Z^{\bullet}$ , which is involved in oxygen evolution.

Crystallographic data on PS II are limited to an electron crystallographic structure with a resolution of 8 Å (17). This resolution is insufficient to determine the position of the electron transfer components apart from chlorophyll molecules. However, a fairly detailed structural model has evolved for the main aspects of the PS II reaction center based on comparative spectroscopic measurements on PS II and purple bacteria reaction centers (18), amino acid sequence comparisons (19), site-directed mutagenesis (20, 21), biochemical studies (22), and computer modeling (23, 24). Spectroscopic approaches, particularly EPR, have provided specific structural information which is gradually replacing the assumptions in the model (16, 25–31).

By using the inherent high resolution of high-field EPR in combination with 1D-oriented samples, it is possible to determine directly the orientation of a radical with respect to the axis of orientation. This method has been applied successfully for  $Y_D^{\bullet}$  (30). Here we present data with improved resolution for this radical both in frozen solution

<sup>†</sup> This work was supported by grants from the Human Frontiers Science Organization (Contract RGO349), from the EU through HCM Grants FMRX-CT98-0214 and FMRX-CT96-0031, and from the Region Ile-de-France (Contract Sesame). P.D. was supported by a fellowship from the CEA.

\* Corresponding author. Fax: 33 (0)1 69 08 87 17. E-mail: sun@ozias.saclay.cea.fr.

<sup>1</sup> Abbreviations: PS II, photosystem II;  $Y_D^{\bullet}$ , stable tyrosyl radical in PS II; Pheo, the pheophytin electron acceptor;  $Q_A$ , the primary electron acceptor of the iron–quinone complex; EPR, electron paramagnetic resonance; ESEEM, electron spin–echo envelope modulation; ENDOR, electron nuclear double resonance; MES, 2-(*N*-morpholino)-ethanesulfonic acid; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid.

and oriented samples (a preliminary account of this work for the orientation of the tyrosyl radical has been presented in ref 30b). We also present high-field EPR spectra of  $Q_A^{\bullet-}$  and the pheophytin anion radical which were generated under reducing conditions in PS II samples pretreated at pH 11 to remove the non-heme iron. By using oriented samples, the orientations of these cofactors were also determined. The results are compared with structural data from bacterial reaction centers.

## MATERIALS AND METHODS

**Sample Preparation.** All biochemical preparations were performed on ice under dim green light unless otherwise stated. Photosystem II membranes were prepared according to the procedure described previously (32). The preparations were frozen at a chlorophyll concentration of about 8 mg of Chl/mL in SMN buffer (sucrose, 0.4 M, MES, 50 mM, pH 6.0, and NaCl, 15 mM) and stored at  $-80^\circ\text{C}$  until used.

Mn depletion was performed by exposing the PS II membranes (0.5 mg of Chl/mL) to room light in a 0.8 M Tris buffer, pH 8.0, for 20 min, followed by two washes in the dark with a 50 mM MES, pH 6.0, and 1 mM EDTA buffer and resuspension in SMN buffer. This treatment also results in the loss of the 17, 24, and 33 kDa extrinsic polypeptides of PS II.

Removal of the non-heme iron was based on the procedure in ref 8. Tris-washed PS II membranes were incubated for 10 min at room temperature in complete darkness in 50 mM glycine, pH 11.0, 0.4 M sucrose, 10 mM NaCl, and 1 mM EDTA. They were then pelleted and washed once with a pH 9.0 glycine buffer.

To generate the semiquinone  $Q_A^{\bullet-}$  radical, the membranes were chemically reduced in complete darkness by one wash (suspension in buffer for 5 min followed by centrifugation for 20 min) with pH 9.0 glycine buffer poised at  $-450$  mV with sodium dithionite and resuspension in the same buffer. This treatment eliminates the  $Y_D^{\bullet}$  radical. The pheophytin radical was induced by illuminating the reduced membranes at 288 K for 12 min. This treatment eliminates the semiquinone by causing its double reduction (12). No redox mediators were used. The redox potential was adjusted with sodium dithionite under anaerobic conditions and was measured with a platinum electrode and a calomel reference electrode. Measured redox potentials were normalized to the standard hydrogen electrode by calibrating the electrode with a saturated quinhydrone solution (potential 286 mV at pH 6.5).

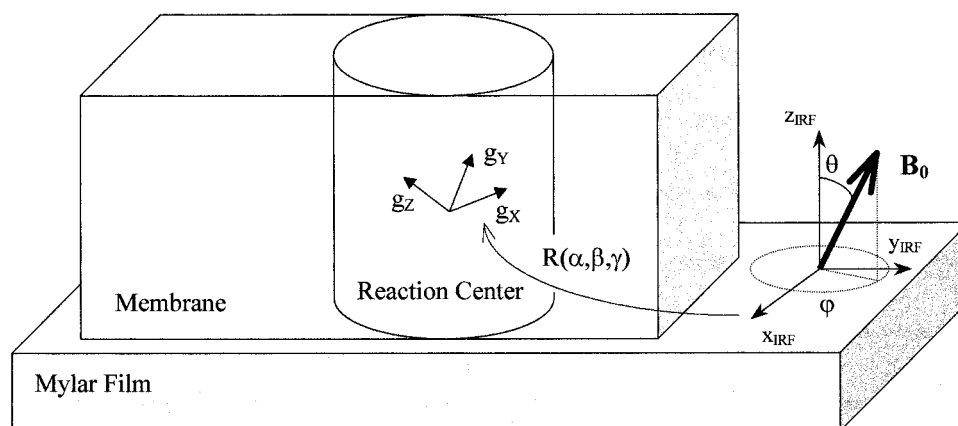
To prepare the oriented samples, the pretreated PS II membrane preparation was painted onto plastic films (3M transparency film, no. PP2500) and dried in a 90% humidity atmosphere in darkness at  $4^\circ\text{C}$ . In this work, EPR spectra were recorded for two different orientations of the plastic films with respect to the magnetic field. The plastic sheets were mounted perpendicular and parallel to the magnetic field (which is vertical in our setup) in two separate tubes. For the orientation corresponding to the magnetic field perpendicular to the film normal, the plastic strips, measuring 20 mm by 2.5 mm, were put into regular quartz EPR tubes. For the orientation corresponding to the magnetic field perpendicular to the films, small plastic squares (5 mm by 5 mm) were stacked horizontally in a polycarbonate tube which

was used as the sample holder. For the determination of the orientation of the quinone and the pheophytin, the prerduced samples were dried on the plastic films under anaerobic conditions. The films were then inserted in the tubes and submerged in a pH 9.0 glycine-buffered dithionite solution which was subsequently frozen in the dark. After determination of the orientation of the semiquinone radical, the samples were brought to 288 K under anaerobic conditions and illuminated for 12 min at the same temperature to induce the pheophytin anion radical.

**EPR Spectroscopy.** Nine GHz EPR spectra were recorded with a TE<sub>102</sub> mode cavity at liquid helium temperatures on a Bruker ESP 300 spectrometer equipped with a liquid helium continuous-flow cryostat and transfer line from Oxford Instruments. The microwave frequency was measured with a Hewlett-Packard 5350B frequency counter connected to the microwave bridge.

Two hundred eighty five GHz EPR spectra were recorded on a lab-built transmission spectrometer, the principles of which are similar to those described by Muller et al. (33). In this case, however, a synthesizer source (ELVA-1, Saint Petersburg, Russia) capable of generating a minimum output power of 100 mW over a 93–97 GHz frequency range was used as the fundamental microwave source. In conjunction with the synthesizer, frequency doubler and tripler (Radio-metric Physics, Menkenheim, Germany) were used to work in the 186–194 GHz and 279–291 GHz frequency ranges (the final power output was 3–4 mW). The signal was detected by using an InSb bolometer (QMC Instruments Ltd., London, England) in conjunction with a lock-in amplifier (SRS, Sunnyvale, CA) and field modulation. The amplitude of the modulation field was calibrated by using a standard sample. The magnetic field was generated by using a superconducting 10.5 T magnet (Oxford Instruments, Oxon, England). The value of the magnetic field was obtained from the magnet power supply with a manufacturer-specified accuracy of  $\pm 0.05$  mT. The absolute magnetic field was calibrated by using a manganese-doped magnesium oxide standard (34). Under conditions with which the data were recorded, the absolute error in  $g$  was  $10^{-4}$ . However, the relative accuracy (difference between two data points of a given spectrum) was better than  $2 \times 10^{-5}$  in  $g$ . Sample temperature regulation was achieved by using a built-in helium flow cryostat.

**Simulations of the Data.** The powder spectra were obtained by calculating the resonant field for  $10^6$  random orientations of the applied magnetic field with respect to the  $g$  axis frame and summing the results. The transition probability was taken to be unity. Except for the spectra of the tyrosyl radical in frozen solution, no hyperfine couplings were included because they were unresolved and contribute only to the line width of the experimental spectra. The resulting orientation-integrated spectra were convoluted with a derivative Gaussian line shape with a suitable line width. Fitting parameters were estimated by nonlinear minimization of the root-mean-square (rms) difference between the experimental and calculated spectra using a standard conjugate gradient method (35). Gaussian distributions were obtained by the method of normal deviates (35). All calculations were performed on a Digital Equipment Corporation workstation by using local programs written in Fortran 77.

Scheme 1: Schematic Representation of a Protein Embedded in a Membrane Oriented on a Plastic Film<sup>a</sup>

<sup>a</sup>The intermediary reference frame (IRF) is linked to the film. The applied magnetic field is expressed in the IRF by using the polar angles ( $\theta$ ,  $\varphi$ ). The IRF is related to the  $g$  axis frame by the rotation  $R(\alpha, \beta, \gamma)$ .

**Theory of EPR for 1D-Oriented Samples.** To calculate the resonance field of a spin, the orientation of the magnetic field with respect to the  $g$  axis system must be known. This orientation is specified by two angles. For powder samples, these angles will take on all possible values. For 1D-oriented samples, their values will be restricted and will depend on the direction of the sample orientation. To facilitate the calculation of spectra of 1D-oriented samples, an intermediate reference frame (IRF) was used (see Scheme 1). The IRF is linked to the plastic film. Its  $z$  axis is along the film perpendicular and also corresponds to the direction along which the protein complexes and membrane fragments are nominally ordered. The IRF  $x$  and  $y$  directions are perpendicular to  $z$  and have no physical significance. To calculate the orientation of the magnetic field with respect to the  $g$  axis system, the following transformation is used:

$$\mathbf{B}_{\text{LAB}} \xrightarrow{R(\theta, \varphi)} \mathbf{B}_{\text{IRF}} \xrightarrow{R(\alpha, \beta, \gamma)} \mathbf{B}_{\text{GA}}$$

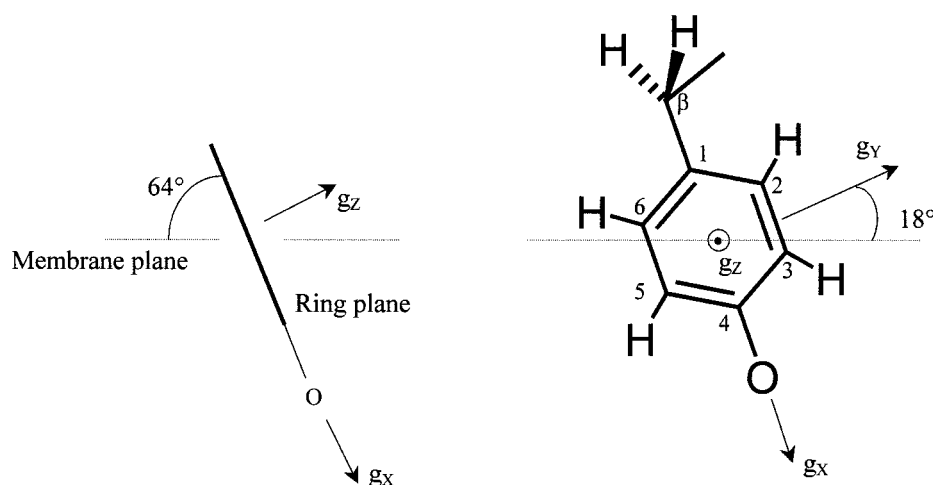
where  $\mathbf{B}_{\text{LAB}}$ ,  $\mathbf{B}_{\text{IRF}}$ , and  $\mathbf{B}_{\text{GA}}$  are vectors of equal magnitude expressed in the laboratory, the intermediary reference, and the  $g$  axis frames, respectively, and  $R$  are rotation matrices which carry out the transformation between the different axis systems. The angles  $\theta$  and  $\varphi$  define the orientation of the magnetic field in the IRF. The transformation between the IRF and the  $g$  axis system is given by three Euler angles:  $\alpha$ ,  $\beta$ , and  $\gamma$  (36). It is used to express the components of  $\mathbf{B}_{\text{IRF}}$  in the  $g$  axis system. The IRF is rotated into the  $g$  axis system by a  $\gamma$ -rotation about  $z_{\text{IRF}}$  followed by a  $\beta$ -rotation about  $y_{\text{IRF}}$ , and finally an  $\alpha$ -rotation about  $z_{\text{IRF}}$ . Orientation averaging was achieved by generating random orientations of the magnetic field in the  $(x, y)$  plane of the IRF (random  $\varphi$  angles) while the angle  $\theta$  between the applied magnetic field and  $z_{\text{IRF}}$  was held constant. The averaging process, in effect, also averages all possible values of the Euler angle  $\alpha$ , and therefore, the oriented spectra are independent of this angle. For an ideally oriented sample,  $z_{\text{IRF}}$  corresponds to the normal of the membrane plane; hence  $\beta$  and  $\gamma$  define the orientation of the  $g$  frame within the photosynthetic membrane. In this paper, the angles defining the orientation of the radicals within the membrane are reported as  $(\beta, \gamma)$  pairs.  $\beta$  is the angle between the  $g_z$  axis and the membrane normal, and  $\gamma$  is the angle between the  $g_x$  axis and the projection of the membrane normal on the  $(g_x, g_y)$  plane.

For these 1D-oriented samples, the angle  $\theta$  between  $z_{\text{IRF}}$  and the applied magnetic field is fixed in the experiment. If the magnetic field is parallel to  $z_{\text{IRF}}$ , then  $\theta$  is  $0^\circ$  and the  $g$  value for the resonance is independent of  $\varphi$  (and  $\alpha$ ). In this case, the EPR resonance field is only determined by  $\beta$  and  $\gamma$ ; the spectrum is identical to that of a single crystal exhibiting a single line. When the magnetic field is perpendicular to  $z_{\text{IRF}}$ ,  $\theta$  is  $90^\circ$  and  $\varphi$  takes all possible values. For each value of  $\varphi$ , a different effective  $g$  value is obtained, resulting in a spectrum which is approximately the difference between the powder spectrum and the single crystal-like spectrum obtained when the magnetic field is parallel to  $z_{\text{IRF}}$  (see Figure 4).

The calculation of the spectra of 1D-oriented samples is determined by three independent angles,  $\theta$ ,  $\beta$ , and  $\gamma$ , and the  $g$  values of the radical. Uncertainty or error in positioning the films within the magnet corresponds to uncertainty or error in  $\theta$ . A distribution in the  $g$  tensor orientation with respect to the normal of the plastic films naturally corresponds to a distribution in both  $\beta$  and  $\gamma$ . Such a distribution arises either from variation in the local membrane normal with respect to  $z_{\text{IRF}}$  (mosaic spread) or from the positional disorder of the radical within the protein. We have modeled this distribution with Gaussian functions, the widths of which were adjusted to fit the experimental data. It is important to note that, for 1D-oriented samples, a distribution of the  $g$  axis system with respect to the applied magnetic field is described by a distribution of two angles. This is due to the fact that, for a given  $(\theta, \varphi)$  position, two more independent angles,  $\beta$  and  $\gamma$ , are needed to define the position of the magnetic field with respect to the  $g$  axis system. The above treatment is identical to that of Blum (37) with respect to the equation for the effective  $g$  value. However, his treatment of the orientation distribution is not correct. Specifically, the assertion by Blum that a distribution of the magnetic field with respect to the film normal (distribution in  $\theta$ ) is equivalent to the distribution of the  $g$  tensor with respect to the film normal due to mosaic spread is incorrect.<sup>2</sup> In fact, as discussed above, the mosaic spread leads to a distribution in the two angles  $\beta$  and  $\gamma$ .

<sup>2</sup> This error has been similarly noted in ref 31 in which the distribution in  $\theta$  was replaced by a distribution in  $\beta$ . However, this is not complete since the mosaic spread will also give rise to a distribution in  $\gamma$ .



Scheme 2: Schematic Representation of the Orientation of  $Y_D^\bullet$  with Respect to the Membrane<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Left: the membrane plane is perpendicular to the plane of the figure. Right: the tyrosine ring plane is in the plane of the figure.

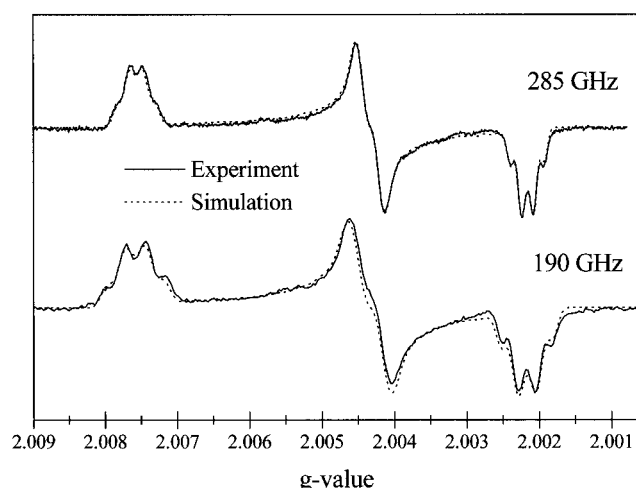


FIGURE 1: Powder spectra of  $Y_D^\bullet$  at 285 and 190 GHz. Solid line: experimental spectra. Dotted line: simulated spectra. Experimental conditions:  $\nu_{mw} = 285.363$  GHz and  $\nu_{mw} = 190.060$  GHz, respectively, modulation amplitude 0.33 mT for both spectra, and temperature 4.2 K. Simulation parameters as listed in Table 1.

## RESULTS

**Tyrosine D.** The EPR powder pattern spectra obtained for the tyrosyl D radical at 190 and 285 GHz are shown in Figure 1. The spectra were recorded with low modulation amplitude to resolve the hyperfine couplings. The calculated spectra are shown along with the experimental data. For the simulations, the three  $g$  values and the anisotropic hyperfine couplings of the 3, 5 and the two  $\beta$  protons (see numbering in Scheme 2) were allowed to vary. The angle between the direction of the 3, 5 proton hyperfine component  $A_x$  and the  $g_x$  direction was also a variable parameter. The directions of the  $A_{z,3,5}$  and  $g_z$  components were assumed to be parallel. The hyperfine tensor for the two  $\beta$ -protons was assumed to be collinear to the  $g$  tensor. A small fixed isotropic coupling of 5 MHz was also included for each of the 2 and 6 ring protons. The final parameters yielding the best fits are shown in Table 1. A detailed comparison of the experimental 190 and 285 GHz spectra plotted with respect to the magnetic field shows an identical resolution for the  $g_z$  edge (see Figure 2). By comparison, the  $g_x$  edge exhibits a slight loss of

Table 1: Parameters Used for the Calculation of the Powder EPR Spectrum of  $Y_D^\bullet$

$g$ values <sup>a</sup>	$g_x = 2.00756$	$g_y = 2.00432$	$g_z = 2.00215$
hyperfine values <sup>b</sup> (MHz)	$A_x$	$A_y$	$A_z$
$A_{3,5}$	24	3	19
$A_{\beta_1}$	7	9	3
$A_{\beta_2}$	31	28	27
$A_{iso\ 2,6}$ (fixed)	5	5	5

<sup>a</sup> A Gaussian distribution of  $3.6 \times 10^{-5}$  half-width at half-maximum for  $g_x$  was used to account for the small  $g$  strain observed. <sup>b</sup> The error in the fitted hyperfine parameters is estimated to be on the order of 5 MHz (0.1–0.2 mT). The angle between  $A_x$  and  $g_x$  for the 3 and 5 ring protons is  $26^\circ$ . For the two  $\beta$  protons the hyperfine tensor is assumed to be collinear to the  $g$  tensor.

resolution at 285 GHz relative to 190 GHz. Better simulations were obtained when the  $g_x$  value was distributed by using a Gaussian function with a half-width of  $3.6 \times 10^{-5}$  in  $g$ . Fit parameters obtained for the 285 GHz spectrum also yielded a simulation which is in very good agreement with the 190 GHz data (see Figure 2).

The experimental spectra obtained for oriented Mn-depleted PS II membranes are shown in Figure 3 along with the simulations. When the magnetic field is perpendicular to the membrane plane, the  $g$  value of the predominant signal is close to the  $g_x$  value; this indicates that the  $g_x$  direction is almost perpendicular to the membrane plane. The experimental spectra for both parallel and perpendicular orientations were fitted simultaneously by using the  $g$  values obtained from the frozen solution and the known angle between the applied magnetic field and the plastic layers. The fitting parameters were the Euler angles defining the orientation of the molecular frame ( $g$  frame) with respect to the intermediate frame associated with the plastic film. The orientation of the  $g$  tensor with respect to the molecule is known for a tyrosyl radical (38). The  $g_z$  axis is perpendicular to the phenyl ring. The  $g_x$  direction corresponds to the carbonyl C–O axis. The  $g_y$  direction is orthogonal to the  $g_x$  direction in the phenyl ring plane. The best fits to the experimental data were obtained for the Euler angles  $64^\circ$  and  $18^\circ$  (see Scheme 2). The phenyl ring plane makes an angle of  $64^\circ \pm 5^\circ$  with the membrane plane. Similar results were obtained for oxygen-evolving preparations (30b).

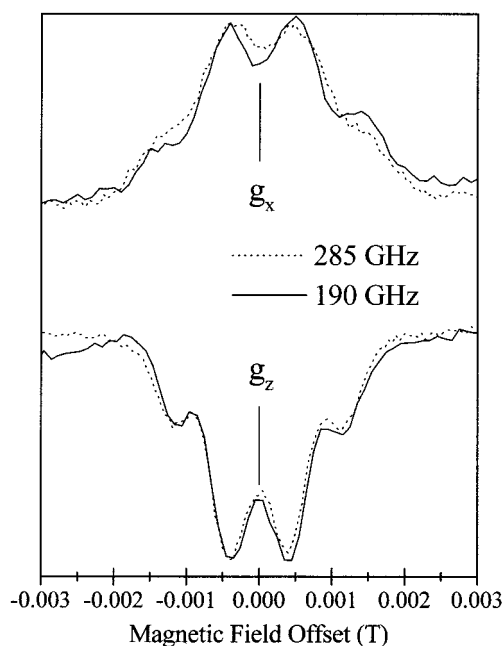


FIGURE 2:  $g_x$  and  $g_z$  edges of the experimental spectra at 285 (dotted line) and 190 GHz (solid line). Experimental conditions as in Figure 1. The apparent resolution of the  $g_z$  region at both frequencies is identical. By comparison, the resolution of the  $g_x$  region of the 285 GHz spectrum is slightly lower than that of the 190 GHz spectrum, indicating the presence of  $g$  strain.

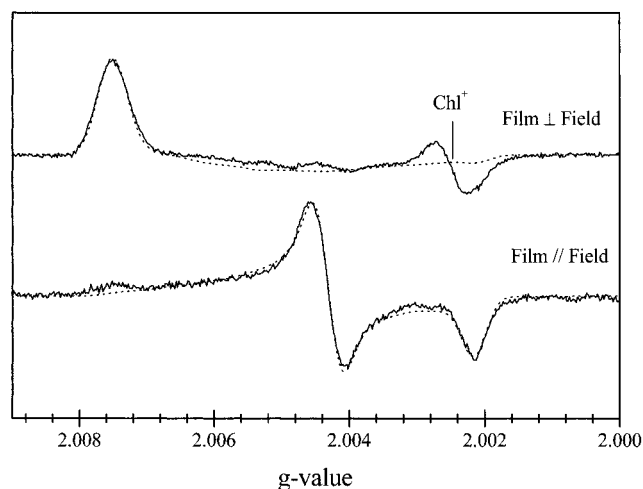


FIGURE 3: High-field EPR spectra of  $Y_D^\bullet$  in oriented PS II membranes. Solid line: experimental spectra. Dotted line: simulated spectra. Experimental conditions: (film  $\perp$  field)  $\nu_{mw} = 284.804$  GHz, modulation amplitude 2.0 mT, and temperature 4.2 K; (film  $\parallel$  field)  $\nu_{mw} = 284.940$  GHz, modulation amplitude 2.0 mT, and temperature 4.2 K. Simulation parameters:  $g$  values as in Table 1,  $\beta = 64^\circ$  (distribution  $20^\circ$ ),  $\gamma = 18^\circ$  (distribution  $20^\circ$ ), and  $\theta = 0^\circ$  (film  $\perp$  field) and  $90^\circ$  (film  $\parallel$  field), respectively.

When the field direction is orthogonal to the plastic films, a single derivative line is expected (see Figure 3<sup>3</sup>). This is not observed experimentally. To account for the observed line shapes, a distribution in two Euler angles,  $\beta$  and  $\gamma$ , needed to be included. The half-width at half-maximum of the distribution required to correctly fit the data for the tyrosyl radical was found to be  $20^\circ$  for both angles.

<sup>3</sup> This figure differs from Figure 4 of ref 30b in which a small distribution in  $\theta$  was mistakenly used to generate the calculated spectra.

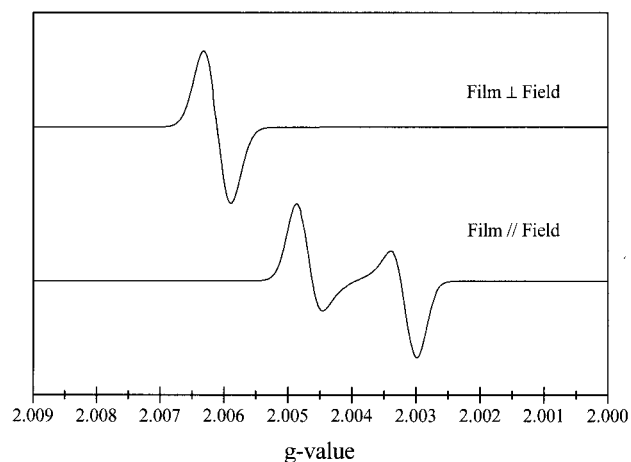


FIGURE 4: Calculated EPR spectra for  $Y_D^\bullet$  in perfectly oriented membranes. Simulation parameters as in Figure 3 except no distribution was used for  $\beta$  and  $\gamma$ .

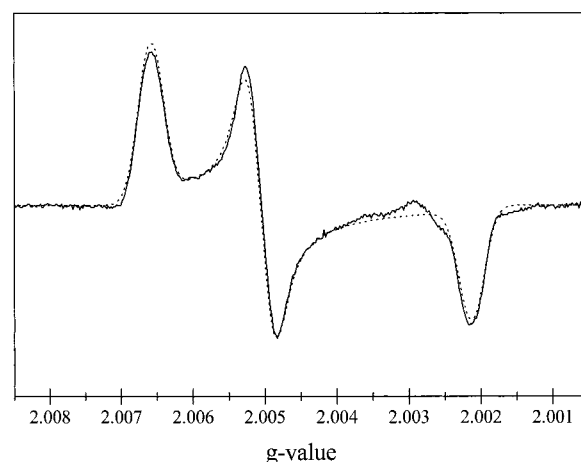
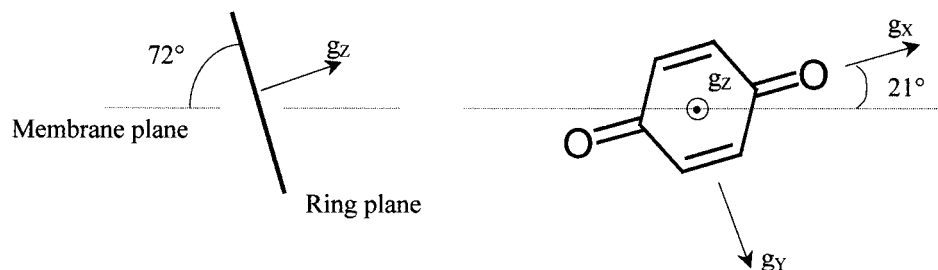


FIGURE 5: Powder spectrum of  $Q_A^{\bullet-}$  at 285 GHz. Solid line: experimental spectrum. Dotted line: simulated spectrum. Experimental conditions:  $\nu_{mw} = 285.090$  GHz, modulation amplitude 2.0 mT, and temperature 4.2 K. Simulation parameters:  $g_x = 2.00661$ ,  $g_y = 2.00506$ , and  $g_z = 2.00215$ .

**Plastosemiquinone  $Q_A$ .** Figure 5 shows the EPR spectrum obtained at 285 GHz for a pH 9.0 frozen solution of iron-depleted PS II containing the  $Q_A^{\bullet-}$  anion radical. The principal  $g$  values obtained by simulating the powder spectrum are 2.00661, 2.00506, and 2.00215 for  $g_x$ ,  $g_y$ , and  $g_z$ , respectively. These values are consistent with values reported in the literature for similar anion semiquinone radical (34, 39). Similar to the 9 GHz spectrum, the hyperfine coupling is unresolved and contributes only to the line width of the signal. The orientation of the  $g$  tensor with respect to the molecule is similar to that of a tyrosyl radical (34). The  $g_x$  axis goes through the carbonyl C—O bonds, the  $g_y$  axis is orthogonal to the  $g_x$  axis in the quinone ring plane, and the  $g_z$  axis is perpendicular to the quinone ring plane.

The spectra obtained for oriented samples of iron-depleted PS II containing the  $Q_A^{\bullet-}$  anion radical are shown in Figure 6. For the orientation that corresponds to the applied magnetic field being perpendicular to the plastic film plane, one signal is observed at the value of  $g_y$ . In the other orientation where the applied magnetic field is parallel to the plastic film plane, two features at the  $g_x$  and  $g_z$  edges are observed. The combination of these results indicates that the  $g_y$  direction

Scheme 3: Schematic Representation of the Orientation of  $Q_A^{\bullet-}$  with Respect to the Membrane<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Left: the membrane plane is perpendicular to the plane of the figure. Right: the quinone ring plane is in the plane of the figure.

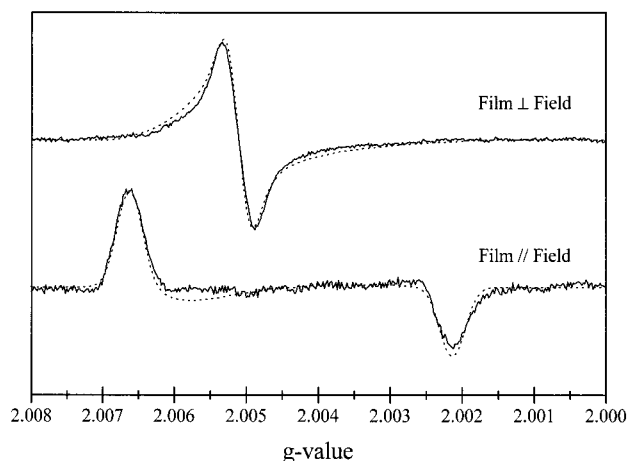


FIGURE 6: High-field EPR spectra of  $Q_A^{\bullet-}$  in oriented PS II membranes. Solid line: experimental spectra. Dotted line: simulated spectra. Experimental conditions:  $\nu_{mw} = 285.636$  GHz, modulation amplitude 2.0 mT, and temperature 4.2 K. Simulation parameters:  $g$  values as in Figure 5,  $\beta = 72^\circ$  (distribution  $20^\circ$ ),  $\gamma = 111^\circ$  (distribution  $20^\circ$ ), and  $\theta = 0^\circ$  (film  $\perp$  field) and  $90^\circ$  (film  $\parallel$  field), respectively.

is nearly perpendicular to the membrane plane. The calculated spectra for the oriented data are plotted in Figure 6. The best fits were obtained for Euler angles of  $72^\circ$  and  $111^\circ$  and a Gaussian distribution of  $20^\circ$  for both angles. The quinone ring plane is oriented at  $72^\circ \pm 5^\circ$  to the membrane plane, and the quinone O—O axis is tilted by  $21^\circ \pm 5^\circ$  in the quinone ring plane compared to the membrane plane (see Scheme 3). Similar results were obtained in  $CN^-$ -treated preparations (data not shown).

**Pheophytin  $Pheo_A$ .** Under strongly reducing conditions, the pheophytin anion can be accumulated when the quinone  $Q_A$  is doubly reduced. The 285 GHz EPR spectrum obtained in frozen solution for the pheophytin  $a$  anion in PS II is shown in Figure 7. The small  $g$  anisotropy of this radical can be resolved at this high frequency. The simulated spectrum is plotted with the experimental spectrum. The  $g$  values obtained from the fit are 2.00424, 2.00316, and 2.00237 for  $g_x$ ,  $g_y$ , and  $g_z$ , respectively. For comparison, we also recorded the 285 GHz EPR spectrum of the bacteriopheophytin  $b$  anion radical obtained in *Rhodospseudomonas viridis* (see Figure 7). The values for the bacteriopheophytin in *R. viridis* are respectively 2.00437, 2.00340, and 2.00239. The  $g_z$  values were the same in both types of reaction center. However, the  $g_x$  and  $g_y$  values were shifted to higher field for the pheophytin in PS II compared to the bacteriopheophytin of *R. viridis*, resulting in a slightly smaller  $g$  anisotropy.

The spectra obtained for the oriented PS II samples containing the pheophytin anion radical are shown in Figure

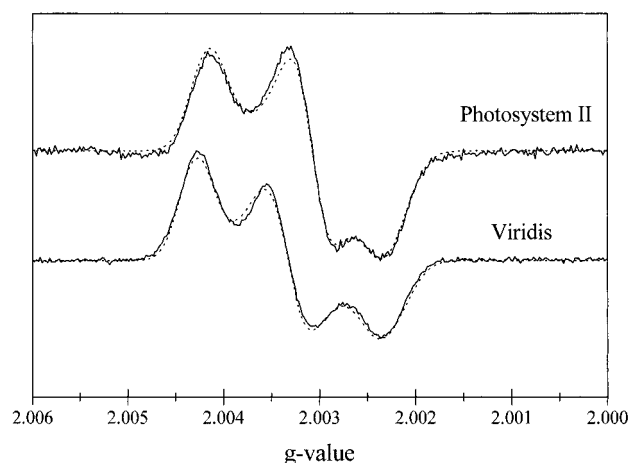


FIGURE 7: High-field powder spectra of  $Pheo^{\bullet-}$  in PS II and  $BPheo^{\bullet-}$  in *R. viridis* at 285 GHz. Solid line: experimental spectra. Dotted line: simulated spectra. Experimental conditions: (PS II)  $\nu_{mw} = 285.090$  GHz, modulation amplitude 2.0 mT, and temperature 4.2 K; (*R. viridis*)  $\nu_{mw} = 285.090$  GHz, modulation amplitude 1.0 mT, and temperature 4.2 K. Simulation parameters: (PS II)  $g_x = 2.00424$ ,  $g_y = 2.00316$ , and  $g_z = 2.00237$ ; (*R. viridis*)  $g_x = 2.00437$ ,  $g_y = 2.00340$ , and  $g_z = 2.00239$ .

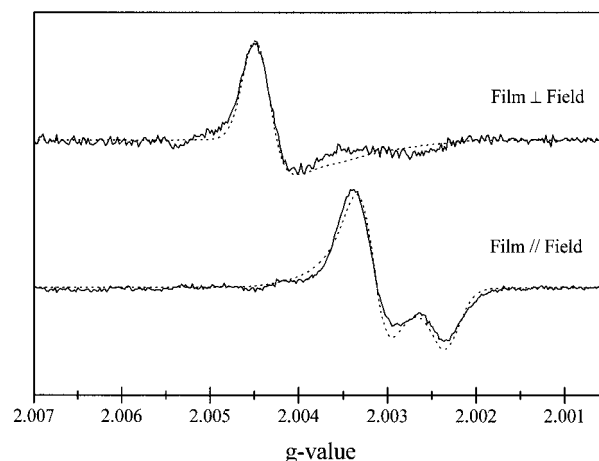
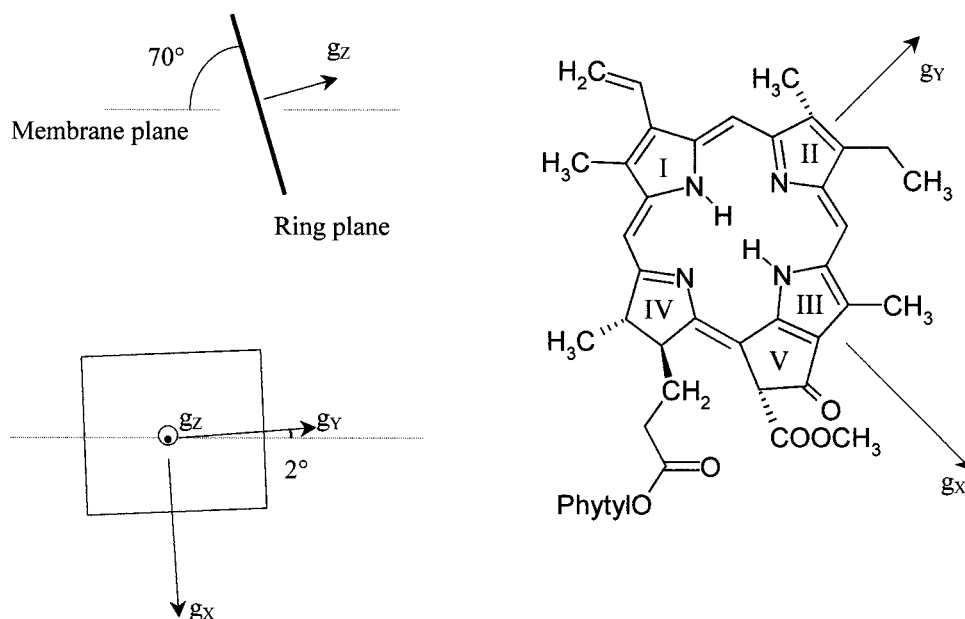


FIGURE 8: High-field EPR spectra of  $Pheo^{\bullet-}$  in oriented PS II membranes. Solid line: experimental spectra. Dotted line: simulated spectra. Experimental conditions:  $\nu_{mw} = 285.090$  GHz, modulation amplitude 1.4 mT, and temperature 4.2 K. Simulation parameters:  $g_x = 2.00451$ ,  $g_y = 2.00320$ ,  $g_z = 2.00237$ ,  $\beta = 70^\circ$  (distribution  $20^\circ$ ),  $\gamma = 2^\circ$  (distribution  $20^\circ$ ), and  $\theta = 0^\circ$  (film  $\perp$  field) and  $90^\circ$  (film  $\parallel$  field), respectively.

8. The total experimental width of the spectra for oriented samples is slightly larger than that observed in the frozen solution spectrum. Hence, a slightly bigger  $g$  anisotropy than that measured for the frozen solution was required in order to properly fit the oriented data. The sample for which the

Scheme 4: Schematic Representation of the Orientation of the  $g$  Tensor of the Pheophytin Anion in PS II with Respect to the Membrane<sup>a</sup>



<sup>a</sup>Left top: the membrane plane is perpendicular to the plane of the figure. Left bottom: the pheophytin ring plane is in the plane of the figure. Right: the position of the principal  $g$  axis with respect to the molecule is shown. See text for details on the assignment.

magnetic field is orthogonal to the plastic film plane shows a predominant signal at a value close to the  $g_x$  value. Furthermore, from theoretical considerations (40), the  $g_z$  axis should be nearly perpendicular to the ring plane, resulting in an orientation for which the plane of the pheophytin is close to perpendicular to the membrane plane with the  $g_x$  direction nearly vertical. Since, for pheophytin radicals, the position of the  $g_x$  and  $g_y$  axes in the plane of the molecule is not known, it is not possible to obtain any more structural information. The Euler angles obtained from the simulations are  $70^\circ$  and  $2^\circ$ , resulting in the pheophytin plane making an angle of  $70^\circ \pm 5^\circ$  with respect to the membrane plane (see Scheme 4). Similar to the tyrosyl and the semiquinone radicals, the distribution was  $20^\circ$  for both angles.

## DISCUSSION

The powder spectra of the stable tyrosyl radical,  $Y_D^\bullet$ , have been recorded at 285 and 190 GHz in frozen solution. From these two spectra, it is possible to determine the  $g$  values and hyperfine coupling constants. The values obtained from the simulations are listed in Table 1. The  $g$  values are consistent with previous measurements (41, 42). The hyperfine values obtained from the high-field EPR spectra are in good agreement with those measured by 9 GHz ENDOR (43, 44) and ESEEM (45) and a previous high-field EPR study.<sup>4</sup>

The  $g_x$  edge of the tyrosyl radical has been shown to be sensitive to the electrostatic environment (46, 47). The  $g_x$  edge broadens very slightly with increasing magnetic field as can be seen by the modest loss in hyperfine resolution (see Figure 2). The fact that this broadening is very slight indicates the virtual absence of distribution in the electrostatic

environment of the tyrosyl radical. This observation indicates that the radical is rigidly positioned and is consistent with previous ESEEM studies (45). Therefore, the large distribution in Euler angles found in the oriented spectra cannot be due to disorder of the tyrosyl radical within the protein.

The alternative explanation for the large distribution in Euler angles is that it is due to mosaic spread: that is, the disorder of the membrane normal with respect to the plastic film plane. Significantly, it was found that the distribution required to correctly simulate the data for the orientation of the semiquinone and the pheophytin anion was the same as for  $Y_D^\bullet$ . This also supports the attribution of the disorder to mosaic spread rather than to a disorder of the radical within the protein. The width at half-maximum of the Gaussian distribution of the Euler angles is rather large. This, however, does not prevent an accurate determination of the angular orientation of the radicals. Spectra, which were simulated by using the same distribution width but with one of the Euler angles shifted by  $10^\circ$ , differed significantly and failed to accurately reproduce the experimental data (30b). Hence we believe the error in the angles defining the orientation of the radicals to be less than  $10^\circ$ , and the values reported for the angles are given plus or minus  $5^\circ$ . Finally, it must be emphasized that, in a generalized rigorous treatment of EPR data for oriented samples, the mosaic spread must be modeled by a distribution over *both* angles defining the orientation of the  $g$  tensor in the IRF. In the simulations shown in this work, no distribution in  $\theta$  was used.

As with tyrosyl radicals, the  $g$  values of semiquinone have been shown to be extremely sensitive to the local electrostatic environment (34, 39). The  $g$  values measured for  $Q_A^{\bullet-}$  are in the range of the experimental (34) and calculated (39) values obtained for model plastoquinones. However, the total  $g$  anisotropy ( $g_x - g_z$ ) is higher for the plastosemiquinone in PS II compare to that measured for the radical in frozen 2-propanol solution (34). This indicates that the electrostatic

<sup>4</sup> It should be noted that the spectra we report exhibit true absorption line shape in comparison to a previous high-field study (42) which explored the dispersion line shape.



environment for the radical in the protein is more electro-neutral than in the 2-propanol glass. This conclusion is especially interesting in light of ESEEM experiments that indicate the proximity of nitrogens reflecting potential hydrogen bond donors (48). Such hydrogen bond donors would contribute an electropositive environment. Therefore, these donors are either weaker than those in 2-propanol or other electronegative contributions offset those of hydrogen bonds.

By using high-field EPR in this work, the orientation of the ring plane and the O—O axis of the semiquinone has been determined. This represents important information for structural models of the PS II reaction center. The acceptor side of PS II has often been compared with that of purple bacteria reaction centers and is thought to be structurally related (18). It is thus of interest to compare the orientation of the semiquinone in PS II with respect to the orientation of  $Q_A$  in purple bacteria reaction centers. We used the coordinates from the crystallographic structures of the reaction centers from *R. viridis* (49) and *Rhodobacter sphaeroides* (50) to calculate the Euler angles defining the orientation of  $Q_A$  in these cases. For these calculations, the normal of the membrane plane was taken as the line joining the non-heme iron to the center of the line joining the two magnesium ions from the special pair. The resulting angle between the membrane plane and the ring of the quinone molecule was  $76^\circ$  for *R. sphaeroides* and  $75^\circ$  for *R. viridis*. This is very close to the  $72^\circ$  angle found here for the plastosemiquinone in PS II. It is also similar to the  $76^\circ$  angle measured for the phyllosemiquinone  $A_1$  in PS I (51, 52). Hence, for all three types of photosystem, the plane of the quinone has the same orientation with respect to the membrane plane. However, the tilt angle between the O—O axis and the intersection of the membrane plane with the quinone plane varies from one system to the other. In *R. sphaeroides* and *R. viridis*, this angle is small, being  $15^\circ$  and  $4^\circ$ , respectively, which makes the O—O axis almost parallel to the membrane plane. In the case of PS II the tilt angle is slightly higher with a value of  $21^\circ$ , while this angle is  $63^\circ$  in PS I (51, 52). In purple bacteria,  $Q_A$  is hydrogen bonded on each of its carbonyl oxygens. One hydrogen bond is provided by a histidine which also coordinates the iron and the other hydrogen bond is provided by a protein backbone nitrogen. This has been proposed also to be the case for PS II based on ESEEM studies (48, 53). The change in the tilt angle for the O—O axis of the semiquinone is small between PS II and the bacterial reaction centers. Differences could be due to the fact that we measured the orientation of the semiquinone radical with EPR whereas it is the orientation of the quinone that is given by the X-ray data. Another possible reason is that the measure for the orientation of the semiquinone was carried out on iron-depleted centers. However, experiments done on  $CN^-$ -treated samples in which the iron is present yielded similar results for the orientation of the semiquinone (data not shown).

The  $g$  anisotropy of the pheophytin  $a$  and bacteriopheophytin  $b$  anions is smaller than that of  $Q_A$  but is still clearly resolvable. Stone has shown (40) that the dominant contribution to  $g$  anisotropy in organic radicals is due to spin—orbit coupling. Furthermore, this contribution is approximately a weighted sum of the constituent atoms (or groups of atoms). The weights depend on the ground-state spin density, atomic

spin—orbit coupling constants, and terms which describe the excited states of the molecule. For  $\pi$ -radicals with low-lying nonbonding excited states, these last terms will significantly enhance the spin—orbit coupling contribution (40). This is expected for pheophytin radicals. Furthermore, for pheophytin radicals, the spin density is expected to be localized on nonprotonated nitrogens and carbonyl oxygens (54). These atoms also have large spin—orbit coupling constants compared to carbon. Taken together, these three contributions more than adequately account for the observed  $g$  anisotropy. There are two possible explanations for the small but measurable difference observed for the plant and bacterial pheophytins. The trivial one is that the intrinsic structural differences induce enough difference in the electronic structure. The second explanation is based on the observation that appreciable spin density resides on the ring V carbonyl oxygen (54), and the energy of the nonbonding orbitals localized on this carbonyl will be sensitive to the local protein environment. Therefore, the observed differences may be more of a reflection of the local protein electrostatic environment than a result of internal structural differences. This sensitivity to the local environment in conjunction with photoaccumulation of the pheophytin radical when the sample is dry could explain the small difference in  $g$  anisotropy observed for the oriented samples compared to the frozen solution data.

The angle of  $70^\circ \pm 5^\circ$  between the ring plane and the membrane plane measured in PS II for the pheophytin  $a$  is comparable with those calculated from the crystallographic data in *R. sphaeroides* and *R. viridis* ( $67^\circ$  and  $65^\circ$ , respectively). This result is in agreement with the linear dichroism study of Ganago et al. (55), who concluded that the pheophytin ring was nearly perpendicular to the membrane plane. The tilt angle of  $2^\circ \pm 5^\circ$  measured in PS II gives the position of the  $g_x$  and  $g_y$  axis in the ring plane. If we assume that the ring position is similar in PS II and purple bacteria reaction centers, we can tentatively assign the  $g_x$  and  $g_y$  directions with respect to the molecule by combining the X-ray data with the measured Euler angles. The  $g_x$  axis appears to go through the protonated nitrogens of rings I and III (see Scheme 4). This direction also coincides with the ring V carbonyl bond direction, similar to tyrosyl and semiquinone radicals. This would be consistent with a relatively large spin—orbit contribution of the ring V carbonyl oxygen to the  $g$  anisotropy as discussed above. The  $g_y$  axis is perpendicular to  $g_x$  in the plane of the molecule and goes through the nonprotonated nitrogens of rings II and IV. Ring II is unsaturated in pheophytin  $a$  compared to bacteriopheophytin  $b$ ; this is likely to induce small geometrical changes for the nitrogen of the ring that could account in part for the bigger change observed in the  $g_y$  value compared to the  $g_x$  value between the two types of radicals.

## CONCLUSION

The present data, using high-field EPR and oriented multilayers, provide more information to add to the structural model of PS II. For  $Q_A$  and Pheo the data confirm the view that PS II has a close structural similarity to the purple bacteria reaction center. These data replace the assumption based on comparative and evolutionary thinking with experimentally measured structural information.

## ACKNOWLEDGMENT

The authors acknowledge Yiannis Deligiannakis for earlier work on the semiquinone anion radical of PS II. We thank Jonathan Hanley for help with preparation of the oriented samples in the beginning of this work and Professor Thomas Prisner for providing the Mn/MgO sample used for the calibration of the magnet in high-field EPR experiments.

## REFERENCES

- Debus, R. J. (1992) *Biochim. Biophys. Acta* 1102, 269.
- Rutherford, A. W., Zimmermann, J.-L., and Boussac, A. (1992) in *The Photosystems: Structure, Function and Molecular Biology* (Barber, J., Ed.) Chapter 5, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.
- Britt, R. D. (1996) in *Oxygenic Photosynthesis: The Light Reactions* (Ort, D. R., and Yocum, C. F., Eds.) pp 137–164, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Diner, B. A., and Babcock, G. T. (1996) in *Oxygenic Photosynthesis: The Light Reactions* (Ort, D. R., and Yocum, C. F., Eds.) pp 213–247, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Klimov, V. V., Dolan, E., Shaw, E. R., and Ke, B. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77, 7227.
- Nugent, J. H. A., Diner, B. A., and Evans, M. C. W. (1981) *FEBS Lett.* 124, 241.
- Rutherford, A. W., and Zimmermann, J.-L. (1984) *Biochim. Biophys. Acta* 767, 168.
- Deligiannakis, Y., Jegerschöld, C., and Rutherford, A. W. (1997) *Chem. Phys. Lett.* 270, 564.
- Sanakis, Y., Petrouleas, V., and Diner, B. A. (1994) *Biochemistry* 33, 9922.
- Astashkin, A. V., Kawamori, A., Kadera, Y., Kuroiwa, S., and Akabori, K. (1995) *J. Chem. Phys.* 102, 5583.
- MacMillan, F., Lendzian, F., Renger, G., and Lubitz, W. (1995) *Biochemistry* 34, 8144.
- Van Mieghem, F. J. E., Nitschke, W., Mathis, P., and Rutherford, A. W. (1989) *Biochim. Biophys. Acta* 977, 207.
- Klimov, V. V., Klevanic, A. V., Shuvalov, V. A., and Krasnovsky, A. A. (1977) *FEBS Lett.* 82, 183.
- Rutherford, A. W., and Mathis, P. (1983) *FEBS Lett.* 154, 328.
- Deligiannakis, Y., and Rutherford, A. W. (1996) *Biochemistry* 35, 11239.
- Koulougliotis, D., Tang, X.-S., Diner, B. A., and Brudvig, G. W. (1995) *Biochemistry* 34, 2850.
- Ree, K.-H., Morris, E. P., Barber, J., and Kühlbrandt, W. (1998) *Nature* 396, 283.
- Rutherford, A. W. (1989) *Trends Biochem. Sci.* 14, 227.
- Michel, H., and Deisenhofer, J. (1988) *Biochemistry* 27, 1.
- Debus, R. J., Barry, B. A., Babcock, G. T., and McIntosh, L. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 427.
- Vermaas, W. F. J., Rutherford, A. W., and Hansson, Ö. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 8477.
- (a) Tang, X.-S., and Satoh, K. (1985) *FEBS Lett.* 179, 60. (b) Yamada, Y., Tang, X.-S., Itoh, S., and Satoh, K. (1987) *Biochim. Biophys. Acta* 891, 129.
- Svensson, B., Vass, I., Cedergren, E., and Styring, S. (1990) *EMBO J.* 9, 2051.
- Ruffle, S. V., Donnelly, D., Blundell, T. L., and Nugent, J. H. A. (1992) *Photosynth. Res.* 34, 287.
- Rutherford, A. W. (1985) *Biochim. Biophys. Acta* 807, 189.
- Kurshev, V. V., Raitsimring, A. M., and Tsvetkov, Y. D. (1989) *J. Magn. Reson.* 81, 441.
- Zech, S. G., Kurreck, J., Eckert, H. J., Renger, G., Lubitz, W., and Bittl, R. (1997) *FEBS Lett.* 414, 454.
- Hara, H., Dzuba, S. A., Kawamori, A., Akabori, K., Tomo, T., Satoh, K., Iwaki, M., and Itoh, S. (1997) *Biochim. Biophys. Acta* 1322, 77.
- Yoshii, T., Kawamori, A., Tonaka, M., and Akabori, K. (1999) *Biochim. Biophys. Acta* 1413, 43.
- (a) Un, S., Brunel, L.-C., Brill, T. M., Zimmermann, J.-L., and Rutherford, A. W. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 5262. (b) Dorlet, P., Hanley, J., Rutherford, A. W., and Un, S. (1998) in *Photosynthesis: Mechanisms and Effects* (Garab, G., Ed.) Vol. II, pp 1395–1398, Kluwer Academic publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Lakshmi, K. V., Eaton, S. S., Eaton, G. R., and Brudvig, G. W. (1999) *Biochemistry* 38, 12758.
- (a) Berthold, D. A., Babcock, G. T., and Yocum, C. F. (1981) *FEBS Lett.* 134, 231. (b) Ford, R. C., and Evans, M. C. W. (1983) *FEBS Lett.* 160, 159.
- Muller, F., Hopkins, M. A., Coron, N., Grynberg, M., Brunel, L. C., and Martinez, G. (1989) *Rev. Sci. Instrum.* 60, 3681.
- Burghaus, O., Plato, M., Rohrer, M., Möbius, K., MacMillan, F., and Lubitz, W. (1993) *J. Phys. Chem.* 97, 7639.
- Press, W. H., Flannery, B. P., Teukolsky, S. A., and Vetterling, W. T. (1986) in *Numerical Recipes*, Cambridge University Press, New York.
- Rose, M. E. (1967) in *Elementary Theory of Angular Momentum*, Wiley, New York.
- Blum, H., Salerno, J. C., and Leigh, J. S., Jr. (1978) *J. Magn. Reson.* 30, 385.
- Fasanella, E. L., and Gordy, W. (1969) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 62, 299.
- Knüpling, M., Törring, J. T., and Un, S. (1997) *Chem. Phys.* 219, 291.
- (a) Stone, A. J. (1963) *Proc. R. Soc. London, Ser. A*, 271, 424. (b) Stone, A. J. (1963) *Mol. Phys.* 6, 509. (c) Stone, A. J. (1964) *Mol. Phys.* 7, 311.
- Un, S., Tang, X.-S., and Diner, B. A. (1996) *Biochemistry* 35, 679.
- Farrar, C. T., Gerfen, G. J., Griffin, R. G., Force, D. A., and Britt, R. D. (1997) *J. Phys. Chem. B* 101, 6634.
- Hoganson, C. W., and Babcock, G. T. (1992) *Biochemistry* 31, 11874.
- Rigby, S. E. J., Nugent, J. H. A., and O'Malley, P. J. (1994) *Biochemistry* 33, 1734.
- Warncke, K., Babcock, G. T., and McCracken, J. (1994) *J. Am. Chem. Soc.* 116, 7332.
- Un, S., Atta, M., Fontecave, M., and Rutherford, A. W. (1995) *J. Am. Chem. Soc.* 117, 10713.
- Mezzetti, A., Maniero, A. L., Brustolon, M., and Giacometti, G. (1999) *J. Phys. Chem. A* 103, 9636.
- Deligiannakis, Y., Hanley, J., and Rutherford, A. W. (1999) *J. Am. Chem. Soc.* 121, 7653.
- Deisenhofer, J., Epp, O., Sinning, I., and Michel, H. (1994) PDB code IPRC (revised IPRCC).
- Yeates, T. O., Komiya, H., Chirino, A., Rees, D. C., Allen, J. P., and Feher, G. (1993) PDB code 4RCR.
- MacMillan, F., Hanley, J., van der Weerd, L., Knüpling, M., Un, S., and Rutherford, A. W. (1997) *Biochemistry* 36, 9297.
- Kamlowski, A., Altenberg-Greulich, B., van der Est, A., Zech, S. G., Bittl, R., Fromme, P., Lubitz, W., and Stehlik, D. (1998) *J. Phys. Chem. B* 102, 8278.
- Astashkin, A. V., Kuroiwa, S., Kawamori, A., and Akabori, K. (1998) *J. Chem. Phys.* 108, 10143.
- (a) O'Malley, P. J. (1999) *J. Am. Chem. Soc.* 121, 3185. (b) O'Malley, P. J. (2000) *J. Phys. Chem. B* 104, 2176.
- Ganago, I. B., Klimov, V. V., Ganago, A. O., Shuvalov, V. A., and Erokhin, Y. E. (1982) *FEBS Lett.* 140, 127.

BI000175L

## High Field EPR Study of the Pheophytin Anion Radical in Wild Type and D1-E130 Mutants of Photosystem II in *Chlamydomonas reinhardtii*\*

Received for publication, March 20, 2001

Published, JBC Papers in Press, April 9, 2001, DOI 10.1074/jbc.M102475200

Pierre Dorlet‡, Ling Xiong§, Richard T. Sayre§, and Sun Un‡¶

From the ‡Département de Biologie Cellulaire et Moléculaire, Section de Bioénergétique, CNRS URA2096, Commissariat à l'Energie Atomique, Saclay, F-91191 Gif-sur-Yvette, France and the §Department of Plant Biology, Ohio State University, Columbus, Ohio 43210-1293

**The intermediate electron acceptor in photosystem II is a pheophytin molecule. The radical anion of this molecule was studied using high field electron paramagnetic resonance in a series of *Chlamydomonas reinhardtii* mutants. Glutamic acid 130 of the D1 polypeptide is thought to hydrogen bond the ring V carbonyl group of this radical. Mutations at this site, designed to weaken or remove this hydrogen bond, strongly affected the  $g$  tensor of the radical. The upward shift of the  $g_x$  component followed the decreasing hydrogen bonding capacity of the amino acid introduced. This behavior is similar to that of tyrosyl and semiquinone radicals. It is also consistent with the optical spectra of the pheophytin in similar mutants. Density functional calculations were used to calculate the  $g$  tensors and rationalize the observed trend in the variation of the  $g_x$  value for pheophytin and bacteriopheophytin radical. The theoretical results support the experimental observations and demonstrate the sensitivity of  $g$  values to the electrostatic protein environment for these types of radicals.**

Photosystem II (PSII)<sup>1</sup> is a large protein complex found in higher plants and green algae that catalyzes the oxidation of water. The structure of PSII has been very recently determined to 3.8 Å resolution (1). The primary electron acceptor in PSII is a pheophytin- $a$  molecule. There are two symmetry-related pheophytins in PSII that differ with respect to the presence or absence of a hydrogen bonding interaction between the pheophytin ring V (Fig. 1 for ring designation) carbonyl group and the protein. Significantly, only the pheophytin (active branch) that is hydrogen-bonded to glutamic acid 130 of polypeptide D1 (D1-E130 residue) via the ring V carbonyl group is reduced following charge separation (2). Site-directed mutagenesis coupled with spectroscopic techniques have proven to be extremely useful tools to characterize pigment-protein interactions. The

resolution of the x-ray structure is currently insufficient to accurately determine such interactions. In this paper, we report on HF-EPR measurements of the Pheo<sup>•−</sup> radical in spinach as well as wild type and site-specific mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*, which can be used to more precisely characterize such interactions between radicals and neighboring protein residues.

The pheophytins in photosynthetic reaction centers have been studied using a variety of methods. Comparative measurements of the carbonyl vibrational frequencies of the bacterial and plant reaction centers using resonance Raman (3) and differential Fourier transform infrared spectroscopy (4) suggested that the ring V carbonyl group was likely to be hydrogen bonded in PSII. Such a hydrogen bond was also inferred from electron nuclear double resonance studies by using deuterium exchange experiments and *in vitro* pheophytin models (5). Modeling studies based on the sequence homology between the PSII D1 and D2 subunits and the bacterial reaction center L and M subunits have been carried out on *C. reinhardtii*, as well as on spinach, pea and *Synechocystis* (6, 7). Mutagenesis studies on *Synechocystis* have also been carried out at the predicted pheophytin hydrogen bonding site (2). These modeling and mutagenesis studies supported the conclusion of the earlier spectroscopic studies that the pheophytin ring V carbonyl group in all PSII complexes is hydrogen-bonded. The likely hydrogen bond donor was identified as the amino acid residue 130 of the D1 subunit, which is homologous to glutamic acid 104 of the L subunit (L-E104) of the bacterial reaction center from *Rhodospseudomonas viridis*. This residue is a glutamine in the case of cyanobacterial PSII and a glutamic acid in the chloroplastic PSII complex.

$g$  values of organic radicals have been shown to be very sensitive probes of the molecular structure and local environment of the radicals (8–10). These  $g$  values are difficult to resolve using conventional 0.3 T/9 GHz EPR. However, by using much higher fields and frequencies, they can be measured more readily. Recently, we have reported the HF-EPR spectrum of the Pheo<sup>•−</sup> radical from wild type spinach PSII as well as of the Bpheo<sup>•−</sup> analog from *R. viridis* (11). We proposed that the differences between the  $g$  tensors of the two radicals reflect differences in intrinsic electronic structure and/or differences in local protein environment. In addition, the results of measurements performed on oriented samples allowed us to fix the three principle directions of the  $g$  tensor to the molecular frame. The  $g_x$  direction was concluded to be along the ring V carbonyl bond, whereas the  $g_z$  direction is perpendicular to the ring plane. The  $g$  tensor orientation is therefore similar to those of the tyrosyl (12) and semiquinone (10) radicals. In both cases, by using HF-EPR and theoretical calculations, it has been

\* This work was supported by Grant RGO349 from the Human Frontiers Science Organization and by grants from the European Union through Human Capital and Mobility Grants FMRX-CT98-0214 and FMRX-CT96-0031 and from the Région Ile-de-France (contract Sesame). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¶ To whom correspondence should be addressed. Tel.: 33-169082842; Fax: 33-169088717; E-mail: sun@ozias.saclay.cea.fr.

<sup>1</sup> The abbreviations used are: PSII, photosystem II; HF-EPR: high field electron paramagnetic resonance; Pheo<sup>•−</sup>: pheophytin anion; Bpheo<sup>•−</sup>, bacteriopheophytin anion; ZORA, zeroth order regular approximation; ADF, Amsterdam density functional; mT, millitesla.



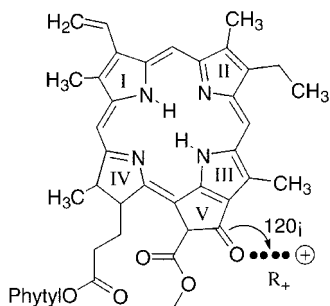


FIG. 1. Scheme and ring numbering of the pheophytin-a molecule. The position of a positive charge located at a distance  $R_+$  from the oxygen carbonyl group as used in the calculations is also shown.

shown that the  $g_x$  value is sensitive to the presence of hydrogen bonds (8, 9) and charged amino acid residues (13). This sensitivity is a direct consequence of the fact that both radicals possess C=O functional groups that carry a significant amount of unpaired spin density. Similarly, computational results (14) have shown that the  $\text{Pheo}^-$  radical also carries appreciable spin density on the ring V carbonyl group. These observations suggest that the  $g_x$  value should be sensitive to local electrostatic environment around the  $\text{Pheo}^-$  ring V carbonyl group. In this paper, we have used the mutants of *C. reinhardtii* in conjunction with HF-EPR to demonstrate the sensitivity of the  $g_x$  value of pheophytin radicals to the electrostatic environment and to directly confirm the presence of a hydrogen bond to the ring V carbonyl group.

#### EXPERIMENTAL PROCEDURES

The isolation of the *C. reinhardtii* wild type and mutants was done as described in Ling *et al.*<sup>2</sup>. The generation of the  $\text{Pheo}^-$  radical in spinach PSII as well as the  $\text{Bpheo}^-$  radical in *R. viridis* has been described elsewhere (11). The procedure to generate the  $\text{Pheo}^-$  radical in *C. reinhardtii* wild type and mutants was similar except that the reduced samples were illuminated at 0 °C for 5 min.

The HF-EPR spectrometer as well as the procedure for simulating the spectra have been described in reference (11). The use of a Mn(II) standard ( $g = 2.00101$ ) (10) was required for calibration and to accurately measure  $g$  values. In this way, the  $g$  values of different samples could be compared with within  $2 \times 10^{-5}$ .

#### RESULTS

Fig. 2 shows the HF-EPR spectra recorded for the  $\text{Bpheo}^-$  radical from *R. viridis* and the  $\text{Pheo}^-$  radical from spinach and *C. reinhardtii* PSII particles (wild type and D1-E130H, D1-E130Q, and D1-E130L mutants). To accurately obtain the  $g$  values of the radical in each case, all six spectra were adequately simulated using a single  $g$  tensor and a line-broadening tensor, the principal axes of which were collinear with the  $g$  tensor. The latter tensor was needed to account for the observed anisotropic broadening that was presumably due to unresolved hyperfine couplings. Hyperfine interactions were not explicitly considered in the calculations. The simulation parameters are given in Table I. The spinach and wild type  $\text{Pheo}^-$   $g$  values were identical to within  $4 \times 10^{-5}$ . The radical in spinach was slightly better resolved. When comparing the  $g$  values measured for the *C. reinhardtii* wild type and mutants, the relationship between hydrogen bonding and  $g$  values is clearly seen on the  $g_x$  edge of the spectra. Like tyrosyl and semiquinone radicals, the  $g_x$  value decreases with increasing hydrogen bonding. Replacement of the hydrogen bond donor by a leucine (D1-E130L) induces a shift of  $20 \times 10^{-5}$  in the  $g_x$  value. A change of  $3 \times 10^{-5}$  in the  $g_x$  values reported in Table I resulted in an increase of the root mean square difference

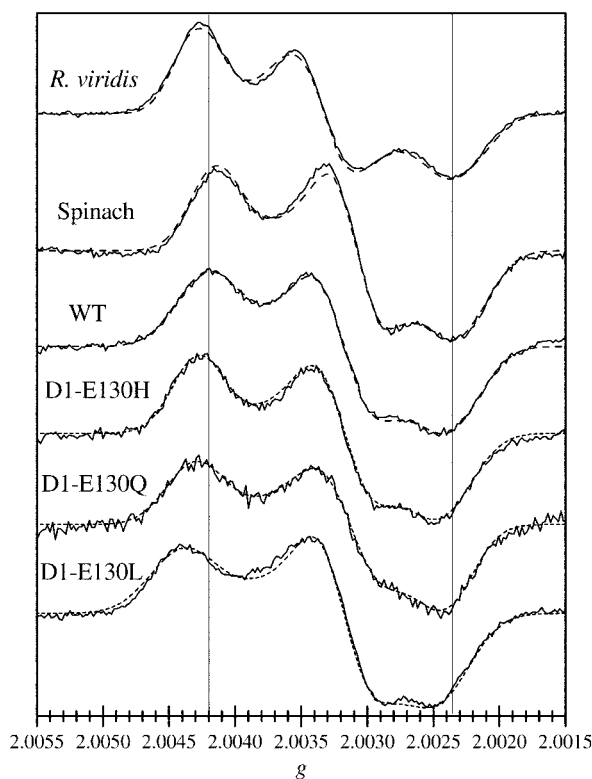


FIG. 2. HF-EPR spectra of the  $\text{Pheo}^-$  in PSII from spinach, wild type (WT) and mutants (D1-E130H, -Q, -L) of *C. reinhardtii* and  $\text{Bpheo}^-$  in *R. viridis*. Unbroken line, experiment; broken line, simulation. The vertical lines give the positions of the wild type  $g_x$  and  $g_z$  values. Experimental conditions: nominal microwave frequency 285 GHz; modulation amplitude 2.0 mT (PSII) and 1.0 mT (*R. viridis*); temperature 4.2 K except for D1-E130L taken at 3.0 K. See Table I for simulation parameters.

between the experimental spectra and simulations of at least 10%. Hence, the differences in the reported  $g_x$  values between the D1-E130H and D1-E130Q mutants and wild type were significant and indicated that the electrostatic influence of the leucine, histidine, glutamine, and glutamic acid side chains were not identical.

To study the effect of the electrostatic environment on the  $\text{Pheo}^-$   $g$  tensor,  $g$  value calculations on prototypic  $\text{Pheo}^-$  and  $\text{Bpheo}^-$  were carried out using the relativistic zeroth order regular approximation (ZORA) method as implemented in the Amsterdam Density Functional (ADF) program package (16–21). The calculations utilized single zeta wavefunctions for hydrogens and carbons and double zeta wavefunctions for nitrogens and oxygens. For carbons, nitrogens, and oxygens, frozen core wavefunctions were used. The calculations were spin-restricted. The molecule used in the calculations was derived from the bacteriopheophytin structure (taken from the Protein Data Bank, accession number 1PRC). The structure was modified to a pheophytin, and standard protons were added. The structure of the entire  $\text{Pheo}^-$  molecule was not used for the calculations for efficiency reasons. All side groups that were not conjugated with the ring conjugation system were replaced by hydrogens. The resulting molecule was geometry-optimized using the PM3 method as implemented in Gaussian 94 (22). Similar methodology has been used in previous density functional theory studies (14). The geometry-optimized structure was planar.  $g$  values using a saddle-shaped structure of the non-optimized structure did not yield significant differences. The geometry-optimized structure was used in all calculations including those involving external point charges. The structure was not reoptimized in the presence of the point charge as

<sup>2</sup> X. Ling, M. Seibert, M. Wasielewski, and R. T. Sayre, manuscript in preparation.

TABLE I  
 $g$  values of Pheo $^-$  and Bpheo $^-$  from simulation of experimental data and ADF-ZORA calculations

	$g_x$	$g_y$	$g_z$	$\Delta H_x$	$\Delta H_y$	$\Delta H_z$
				$mT$	$mT$	$mT$
PSII Pheo $^-$						
Spinach <sup>a</sup>	2.00424	2.00316	2.00237	2.1	2.0	2.1
<i>C. reinhardtii</i>						
E130	2.00420	2.00320	2.00236	2.9	2.2	2.8
E130H	2.00429	2.00319	2.00242	2.4	2.2	2.9
E130Q	2.00431	2.00316	2.00240	2.7	2.6	2.6
E130L	2.00440	2.00321	2.00243	3.0	2.3	2.9
ZORA						
No charge	2.00463	2.00325	2.00204			
1.8 Å charge	2.00425	2.00344	2.00206			
Bacterial Bpheo $^-$						
<i>R. viridis</i> <sup>a</sup>	2.00437	2.00340	2.00239	2.0	2.1	2.2
ZORA						
No charge	2.00487	2.00335	2.00235			
2.0 Å charge	2.00453	2.00339	2.00228			

<sup>a</sup> From Ref. 11.

neither ADF nor Gaussian 94 packages permitted this. To simulate electrostatic effects, a positive point charge located 120° relative to the ring V carbonyl bond at varying distances (Fig. 1), was incorporated into the calculations. The results of the ZORA calculations are summarized in Table I along with the experimental measurements. The variations of the calculated  $g_x$  values for the pheophytin and bacteriopheophytin model molecules as a function of the oxygen-point charge distance are plotted in Fig. 3.

#### DISCUSSION

The HF-EPR spectroscopy of the Pheo $^-$  radical in wild type and mutants of *C. reinhardtii* confirms the sensitivity of  $g$  values to the protein microenvironment for this type of radical as was predicted earlier (11). The shift observed in the  $g_x$  value between the wild type and D1-E130L mutant is caused by a red shift of the  $n \rightarrow \pi^*$  electronic excitation upon the loss of the hydrogen bond on the ring V carbonyl group. This can be compared with a hydrogen bond-induced  $g_x$  shift of  $200 \times 10^{-5}$  for tyrosyl radicals (9) that carry  $\sim 25\%$  of spin density on the phenolic oxygen. This result provides strong experimental evidence for the presence of non-negligible ring V oxygen spin density (14). The removal of the hydrogen bond interaction is supported by a blue shift of 2.5 nm in the Pheo $^-$   $Q_x$  ( $\pi \rightarrow \pi^*$ ) band observed in *C. reinhardtii* as well as in the corresponding mutant in *Synechocystis* relative to the wild type. The opposite shifts of the two types of electronic excitations are entirely consistent with generally accepted interpretation of hydrogen bonding effects on electronic absorption spectra (23). When the D1-Q130 residue in wild type *Synechocystis* is mutated to a glutamic acid, the Pheo $^-$   $Q_x$  ( $\pi \rightarrow \pi^*$ ) band red shifts to the same wavelength as that of plant (*Pisum sativum*) indicating a strengthening of the hydrogen bond (2). The HF-EPR results are entirely consistent with these optical results. The *C. reinhardtii* D1-E130Q mutant exhibits a  $g_x$  shift of  $+10 \times 10^{-5}$  indicating a weakening of the hydrogen bond when the glutamic acid is replaced by a glutamine. These shifts in electronic states point to the possibility that the redox potential of the pheophytin is also modified by the hydrogen bond.

In the context of hydrogen bonding, the similarity in  $g$  values between D1-E130H and D1-E130Q mutants and the wild type is not surprising. All three amino acids are capable of hydrogen bonding. In fact, the  $g$  values of the D1-E130H and D1-E130Q mutants and wild type differ only slightly. The ordering roughly follows that of increasing electronegativity: glutamic acid, histidine, glutamine, leucine. Because the dipole moment of an OH group is higher than that of an NH group one would expect that, for a given geometry, a histidine and a glutamine

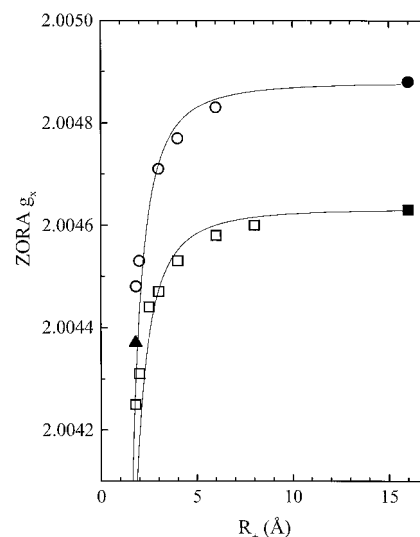


FIG. 3. Dependence of the theoretical ZORA  $g_x$  values on the charge-oxygen distance. Circles, calculation for bacteriopheophytin model; squares, calculation for pheophytin model; filled symbols, the limiting value in the absence of a charge; filled triangle, experimental value for *R. viridis*. The solid lines represent a simple  $1/(R_+ - 0.5)^2$  dependence.

are likely to be weaker hydrogen bond donors than a glutamic acid. Without crystallographic data, we cannot rigorously exclude the possibility that the mutations have caused electrostatic changes in the pheophytin environment other than those intended. However, the observed trends in  $g_x$  values are clearly consistent with the expected effects of hydrogen bonding and are very similar to those observed for tyrosyl and semiquinone radicals. To quantitatively analyze the magnitude of the hydrogen bonding effect, we carried out *ab initio* quantum mechanics calculation of the  $g$  values.

The Bpheo $^-$  ZORA  $g$  values were in good agreement with experiment. By contrast, the Pheo $^-$  ZORA  $g$  values only modestly agreed. For both Pheo $^-$  and Bpheo $^-$ , the calculated  $g_x$  direction was within 10° of the carbonyl bond with the exact value depending on the charge-oxygen distance, and the  $g_z$  direction was always perpendicular to the ring plane. This was independent of the dihedral angle of the side groups relative to ring plane. The near collinearity of the  $g_x$  direction with the carbonyl bond is consistent with theoretical predictions (24–26) and our previous assignment based on HF-EPR measurements performed on oriented samples (11). The best agreement between the Bpheo $^-$  experimental data was found when the point charge was 2.0 Å away from the bacteriopheophytin ox-

ygen atom. In the *R. viridis* crystallographic structure, the L-E104 carboxylic acid oxygen is 2.7 Å away with the proton presumably about 1 Å closer. Similar to tyrosyl and semiquinone radicals (15), the pheophytin  $g_x$  values followed an  $r^{-2}$  dependence on the charge-oxygen distance (Fig. 3). For both radicals, the ZORA calculations predicted that a positive charge at 1.8 Å will contribute a shift of as much as  $40 \times 10^{-5}$  in the  $g_x$  value. The difference between wild type and D1-E130L mutant was  $20 \times 10^{-5}$ . Some of the differences between experiment and theory are likely due to the fact that a full positive charge has a much stronger effect than a hydrogen bond. Further computational studies are needed to better understand the discrepancies between the calculated and experimental  $g$  values. Nonetheless, the observed increase in the  $g_x$ -values due to the weakening of the hydrogen bond in the mutants is predicted by the ZORA calculations.

The experimental and theoretical results reported in this paper suggest that the differences in  $g$  values between Bp $\text{pheo}^-$  in *R. viridis* and Pheo $^-$  in spinach are largely due to structural differences. The specific  $g_x$  values reflect hydrogen bonding to the ring V carbonyl group. These results taken together with previous work on tyrosyl, semiquinones, chlorophyll, and carotenoid radicals demonstrate the usefulness of HF-EPR in probing the structure of and protein environment around radicals.

**Acknowledgments**—We thank Drs. A. W. Rutherford and T. Mattioli for fruitful discussions and G. Voyard for technical assistance.

#### REFERENCES

1. Zouni, A., Witt, H.-T., Kern, J., Fromme, P., Krauss, N., Saenger, W., and Orth, P. (2001) *Nature* **409**, 739–743
2. Giorgi, L. B., Nixon, P. J., Merry, S. A. P., Joseph, D. M., Durrant, J. R., De Las Rivas, J., Barber, J., Porter, G., and Klug, D. R. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 2093–2101
3. Moëne-Loccoz, P., Robert, B., and Lutz, M. (1989) *Biochemistry* **28**, 3641–3645
4. Navedryk, E., Andrianambinintsoa, S., Berger, G., Leonhard, M., Mäntele, W., and Breton, J. (1990) *Biochim. Biophys. Acta* **1016**, 49–54
5. Lubitz, W., Isaacson, R. A., Okamura, M. Y., Abresch, E. C., Plato, M., and Feher, G. (1989) *Biochim. Biophys. Acta* **977**, 227–232
6. Xiong, J., Subramanian, S., and Govindjee (1998) *Photosynth. Res.* **56**, 229–254
7. Svensson, B., Vass, I., Cedergren, E., and Styring, S. (1990) *EMBO J.* **9**, 2051–2059
8. Knüpling, M., Törring, J. T., and Un, S. (1997) *Chem. Phys.* **219**, 291–304
9. Un, S., Atta, M., Fontecave, M., and Rutherford, A. W. (1995) *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 10713–10719
10. Burghaus, O., Plato, M., Rohrer, M., Möbius, K., MacMillan, F., and Lubitz, W. (1993) *J. Phys. Chem.* **97**, 7639–7647
11. Dorlet, P., Rutherford, A. W., and Un, S. (2000) *Biochemistry* **39**, 7826–7834
12. Fasanella, E. L., and Gordy, W. (1969) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **62**, 299–304
13. Un, S., Gerez, C., Elleingand, E., and Fontecave, M. (2001) *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 3048–3054
14. O'Malley, P. J. (2000) *J. Phys. Chem.* **104**, 2176–2182
15. Un, S., Tang, X. S., and Diner, B. A. (1996) *Biochemistry* **35**, 679–684
16. van Lenthe, E., Snijders, J. G., and Baerends, E. J. (1996) *J. Chem. Phys.* **105**, 6505–6516
17. Amsterdam Density Functional Program Package, Version ADF1999.02, (1999), Scientific Computing and Modelling NV, Vrije Universiteit, Amsterdam, The Netherlands
18. Baerends, E. J., Ellis, D. E., and Ros, P. (1973) *Chem. Phys.* **2**, 41–51
19. Versluis, L., and Ziegler, T. (1988) *J. Chem. Phys.* **88**, 322–328
20. te Velde, G., and Baerends, E. J. (1992) *J. Comput. Phys.* **99**, 84–98
21. Fonseca Guerra, C., Snijders, J. G., te Velde, G., and Baerends, E. J. (1998) *Theor. Chem. Acc.* **99**, 391–403
22. Frisch, M. J., Trucks, G. W., Schlegel, H. B., Gill, P. M. W., Johnson, B. G., Robb, M. A., Cheeseman, J. R., Keith, T., Petersson, G. A., Montgomery, J. A., Raghavachari, K., Al-Laham, M. A., Zakrzewski, V. G., Ortiz, J. V., Foresman, J. B., Cioslowski, B. B., Stefanov, B. B., Nanayakkara, A., Challacombe, M., Peng, C. Y., Ayala, P. Y., Chen, W., Wong, M. W., Andres, J. L., Replogle, E. S., Gomperts, R., Martin, R. L., Fox, D. J., Binkley, J. S., Defrees, D. J., Baker, J., Stewart, J. P., Head-Gordon, M., Gonzales, C., and Pople, J. A. (1995) *Gaussian 94*, Revision E.2., Gaussian Inc., Pittsburgh, PA
23. Pimentel, G. C., and McCellan, A. L. (1960) *The Hydrogen Bond*, pp. 157–166, Freeman and Co., San Francisco
24. Stone, A. J. (1963) *Proc. R. Soc. Lond. Ser. A* **271**, 424–434
25. Stone, A. J. (1963) *Mol. Phys.* **6**, 509–515
26. Stone, A. J. (1964) *Mol. Phys.* **7**, 311–316

# Multifrequency High-Field EPR Study of the Tryptophanyl and Tyrosyl Radical Intermediates in Wild-Type and the W191G Mutant of Cytochrome *c* Peroxidase

Anabella Ivancich,<sup>‡</sup> Pierre Dorlet,<sup>‡</sup> David B. Goodin,<sup>§</sup> and Sun Un<sup>\*,‡</sup>

Section de Bioénergétique, URA 2096 CNRS, Département de Biologie Cellulaire et Moléculaire, CEA Saclay, 91191 Gif-sur-Yvette, France, and Department of Molecular Biology, The Scripps Research Institute, 10550 North Torrey Pines Road, La Jolla, California 92037.

Received October 11, 2000. Revised Manuscript Received March 14, 2001

**Abstract:** Multifrequency (95, 190, and 285 GHz) high-field electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy has been used to characterize radical intermediates in wild-type and Trp191Gly mutant cytochrome *c* peroxidase (CcP). The high-field EPR spectra of the exchange-coupled oxoferryl–tryptophanyl radical pair that constitutes the CcP compound **I** intermediate [(Fe(IV)=O) Trp<sup>•+</sup>] were analyzed using a spin Hamiltonian that incorporated a general anisotropic spin–spin interaction term. Perturbation expressions of this Hamiltonian were derived, and their limitations under high-field conditions are discussed. Using numerical solutions of the completely anisotropic Hamiltonian, it was possible to simulate accurately the experimental data from 9 to 285 GHz using a single set of spin parameters. The results are also consistent with previous 9 GHz single-crystal studies. The inherent superior resolution of high-field EPR spectroscopy permitted the unequivocal detection of a transient tyrosyl radical that was formed 60 s after the addition of 1 equiv of hydrogen peroxide to the wild-type CcP at 0 °C and disappeared after 1 h. High-field EPR was also used to characterize the radical intermediate that was generated by hydrogen peroxide addition to the W191G CcP mutant. The *g*-values of this radical (*g*<sub>x</sub> = 2.00660, *g*<sub>y</sub> = 2.00425, and *g*<sub>z</sub> = 2.00208), as well as the wild-type transient tyrosyl radical, are essentially identical to those obtained from the high-field EPR spectra of the tyrosyl radical generated by  $\gamma$ -irradiation of crystals of tyrosine hydrochloride (*g*<sub>x</sub> = 2.00658, *g*<sub>y</sub> = 2.00404, and *g*<sub>z</sub> = 2.00208). The low *g*<sub>x</sub>-value indicated that all three of the tyrosyl radicals were in electropositive environments. The broadening of the *g*<sub>x</sub> portion of the HF-EPR spectrum further indicated that the electrostatic environment was distributed. On the basis of these observations, possible sites for the tyrosyl radical(s) are discussed.

## Introduction

Amino acid residues have proved to be relevant for enzyme catalysis as redox-active cofactors of an increasing number of metalloenzymes<sup>1</sup>. Tyrosyl and tryptophanyl radicals have been proposed to have a specific role in electron and proton-transfer processes in photosystem II,<sup>2,3</sup> ribonucleotide reductase,<sup>4</sup> prostaglandin H-synthase,<sup>5,6</sup> and DNA photolyase.<sup>7,8</sup> The catalytic intermediate of most heme catalases and peroxidases is believed to comprise a cationic porphyrinyl radical similar to the well-characterized compound **I** intermediates of horseradish peroxi-

dase<sup>9</sup> and chloroperoxidase.<sup>10</sup> At variance, a tryptophanyl radical was identified as the catalytic intermediate of cytochrome *c* peroxidase.<sup>11–14</sup> The mechanism for the selective stabilization of the porphyrinyl or tryptophanyl radicals as the catalytic intermediates is not well-understood. From a comparative study between the active site structure of ascorbate and cytochrome *c* peroxidases, including mutations<sup>15</sup> and theoretical calculations,<sup>15,16</sup> it was proposed that the electrostatic environment and redox potentials of the porphyrin or the protein redox cofactors are responsible for the selectivity.

The catalytic site of heme catalases and peroxidases consists of an iron–protoporphyrin IX prosthetic group. The iron is pentacoordinated and in the high-spin Fe(III) oxidation state for the native enzymes. A common property of catalases and

\* To whom correspondence should be addressed: Centre d'Etudes de Saclay, Section de Bioénergétique, Bat. 532, 91191 Gif-sur-Yvette, France. Tel: +33 1 69 08 28 42. Fax: +33 1 69 08 87 17. E-mail: sun@ozias.saclay.cea.fr.

<sup>‡</sup> CEA Saclay.

<sup>§</sup> The Scripps Research Institute.

(1) Stubbe, J.; van der Donk, W. A. *Chem. Rev.* **1998**, 98, 705–762.

(2) Tommos, C.; Babcock, G. T. *Acc. Chem. Res.* **1998**, 31, 18–25.

(3) Tommos, C.; Babcock, G. T. *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, 1458, 199–219.

(4) Gräslund, A.; Sahlin, M. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1996**, 25, 259–286.

(5) Smith, W. L.; Eling, T. E.; Kulmacz, R. J.; Marnett, L. J.; Tsai, A. *Biochemistry* **1992**, 31, 3–7.

(6) Shi, W.; Hoganson, C. W.; Espe, M.; Bender, C. J.; Babcock, G. T.; Palmer, G.; Kulmacz, R. J.; Tsai, A. *Biochemistry* **2000**, 39, 4112–4121.

(7) Kim, S. T.; Heelis, P. F.; Sancar, A. *Methods Enzymol.* **1995**, 258, 319–343.

(8) Aubert, C.; Vos, M. H.; Mathis, P.; Eker, A. P. M.; Brettel, K. *Nature* **2000**, 405, 586–590.

(9) Schulz, C. E.; Devaney, P. W.; Wrinkler, H.; Debrunner, P. G.; Doan, N.; Chiang, R.; Rutter, R.; Hager, L. P. *FEBS Lett.* **1979**, 103, 102–105.

(10) Rutter, R.; Hager, L. P.; Dhonau, H.; Hendrich, M.; Valentine, M.; Debrunner, P. *Biochemistry* **1984**, 23, 6809–6816.

(11) Sivaraja, M.; Goodin, D. B.; Smith, M.; Hoffman, B. *Science* **1989**, 245, 738–740.

(12) Mauro, J. M.; Fishel, L. A.; Hazzard, J. T.; Meyer, T. E.; Tollin, G.; Cusanovich, M. A.; Kraut, J. *Biochemistry* **1988**, 27, 6243–6256.

(13) Erman, J. E.; Vitello, L. B.; Mauro, J. M.; Kraut, J. *Biochemistry* **1989**, 28, 7992–7995.

(14) Hoffman, B. M. *Acc. Chem. Res.* **1991**, 24, 164–170.

(15) Bonagura, C. A.; Sundaramoorthy, M.; Pappa, H. S.; Patterson, W. R.; Poulos, T. L. *Biochemistry* **1996**, 35, 6107–6115.

(16) Jensen, G. M.; Bunte, S. W.; Warshel, A.; Goodin, D. B. *J. Phys. Chem. B* **1998**, 102, 8221–8228.



peroxidases is the formation of the highly oxidizing intermediate, currently referred to as compound **I**,<sup>17</sup> which catalyzes the oxidation of various substrates (for a review, see ref 18). This intermediate originates from the two-electron oxidation of the native enzyme by hydrogen peroxide to generate the oxoferryl state (Fe(IV)=O) and the concomitant formation of a porphyrinyl (por<sup>+</sup>) or a tryptophanyl (Trp<sup>+</sup>) radical cation. The spectroscopic characterization of the radical species of CcP compound **I**, combined with site-directed mutagenesis studies have unequivocally identified the site of the radical formation as Trp191.<sup>11</sup>

The axial EPR signal observed for the compound **I** in cytochrome *c* peroxidase at 9 and 35 GHz could be modeled by a weak exchange coupling of a tryptophanyl radical and the oxoferryl moiety,<sup>11</sup> including a distribution in *J* values.<sup>19,20</sup> Such a distribution of ferro- and antiferro-magnetic interaction was also invoked to explain the very broad EPR signal of the porphyrinyl radical intermediate in horseradish peroxidase<sup>9</sup> and the axial EPR signal of compound **I** in *Micrococcus lysodeikticus* catalase.<sup>21</sup> The variation of the distribution in the exchange-coupling interaction between the tryptophanyl radical and the oxoferryl moiety has been directly correlated to the changes in the 9 GHz EPR spectrum of the compound **I** intermediate observed for the His175<sup>22,23</sup> and Asp235<sup>19</sup> mutants of cytochrome *c* peroxidase.

A limited number of heme catalase and peroxidase intermediates have been studied by EPR and ENDOR spectroscopies, two techniques that are well-suited to specifically identify the nature of the radical species formed during the catalytic cycle. Examples include catalases from *M. lysodeikticus*,<sup>21</sup> *Proteus mirabilis*, and bovine liver<sup>24,25</sup> and peroxidases such as the chloroperoxidase,<sup>10</sup> cytochrome *c*,<sup>11,19,20</sup> lignin,<sup>26</sup> and ascorbate<sup>15</sup> peroxidases. For some of these enzymes, the use of the rapid-mix freeze-quench technique combined with EPR spectroscopy has allowed the detection of two different radical intermediates arising from the sequential oxidation of the porphyrin macrocycle and a protein amino acid. Specifically, tyrosyl radical intermediates have been reported for the peroxidase cycle of prostaglandin synthase<sup>27,28</sup> and for bovine liver catalase.<sup>24</sup> The EPR spectrum of amino acid-based radicals at conventional fields (0.3 T, 9 GHz) is dominated by partially resolved hyperfine couplings of the electron spin and the adjacent protons. The small *g*-anisotropy inherent to such radical species is not resolved in the 9 GHz EPR spectra. In contrast, at higher fields (95–285 GHz), it is possible to resolve the *g*-anisotropy of

amino acid-based radicals. It has been demonstrated that the *g*-values are sensitive to the electrostatic environment of tyrosyl radicals.<sup>29–32</sup> Moreover, multifrequency EPR (9–285 GHz) has been used to better characterize the nature of the exchange coupling interaction for two *S* = 1/2 interacting systems.<sup>33,34</sup>

We have combined multifrequency EPR and spectral simulations to further characterize the [(Fe(IV)=O) Trp<sup>+</sup>] intermediate of wild-type cytochrome *c* peroxidase. The tryptophanyl radical in exchange interaction with the oxoferryl moiety can be modeled by a powder-pattern spectrum with effective *g*-values that depend on the interaction parameters, the zero-field splitting (*D*) of the oxoferryl iron, and the *g*-values of the interacting species. The use of several frequencies (9, 95, 190 and 285 GHz) provided stricter constraints on the simulations of the EPR spectrum. Moreover, by modeling the spin coupling as an anisotropic interaction instead of as a sum of isotropic exchange terms,<sup>19</sup> it was possible to obtain a representation that was consistent with both the frozen-solution and the single-crystal data. We were able to clarify the issue on the narrow signal reported previously<sup>42–44,19</sup> for the wild-type (WT) and mutant compound **I** samples of CcP by using the greater *g*-anisotropy resolution of high-field (285 GHz) EPR and different mixing times. We have also characterized the compound **I** intermediate of the W191G mutant CcP. The multifrequency EPR spectrum of the W191G compound **I** radical showed hyperfine couplings and *g*-values that are typical of tyrosyl radicals in an electro-positive environment. Possible candidates for the radical site are discussed.

## Materials and Methods

**Sample Preparation.** The WT MKT-CcP samples were obtained from the protein expression in *Escherichia coli* by the plasmid pT7CCCCP under control of the T7 promoter. CcP-MKT differs from the yeast wild type in positions 53 and 152 as well as the Met-Lys-Thr on the N-terminus.<sup>35</sup> The W191G mutant of CcP was constructed by site-directed mutagenesis, overexpressed in *E. coli* BL21(DE3) and purified as previously described.<sup>36</sup> The compound **I** intermediates of the wild type and the W191G mutant CcP samples used for the EPR measurements were prepared by manually mixing directly in the 4-mm EPR tubes kept at 0 °C 2.5 mM native enzyme (100 mM potassium phosphate buffer, pH = 6.0) with equimolar/equivolume hydrogen peroxide. The reaction was stopped by rapid immersion of the EPR tube in liquid nitrogen, the overall procedure taking 15 s. For some of the experiments, the mixing time was increased up to 2 h by further incubation of compound **I** samples in ice (see Results). Stock solutions of hydrogen peroxide were prepared by dilution of 30% (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Aldrich) in phosphate buffer. The concentration was determined by absorbance measurements at 240 nm ( $\epsilon$  = 39.4 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>).<sup>37</sup>

**Generation of the In Vitro Tyrosyl Radical.** Single crystals of tyrosine-HCl were obtained by slow evaporation, at room temperature, of L-tyrosine (Sigma) dissolved in a 30% solution of hydrochloric acid.

(17) In the case of CcP, the catalytically active intermediate has been referred to as compound ES to differentiate the protein-based radical in CcP from the porphyrin-based radical in horseradish peroxidase.

(18) Dunford, B. H. *Heme Peroxidases*; John Wiley & Sons: New York, 1999.

(19) Housseman, A. L.; Doan, P.; Goodin, D. B.; Hoffman, B. M. *Biochemistry* **1993**, *32*, 4430–4443.

(20) Huyett, J. E.; Doan, P. E.; Gurbel, R.; Houseman, A. L. P.; Sivaraja, M.; Goodin, D. B.; Hoffman, B. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 9033–9041.

(21) Benecky, M. J.; Frew, J. E.; Scowen, N.; Jones, P.; Hoffman, B. *Biochemistry* **1993**, *32*, 11929–11933.

(22) Hirst, J.; Wilcox, S. K.; Ai, J.; Jingyuan, A.; Moenne-Loccoz, P.; Loehr, T.; Goodin, D. B. *Biochemistry* **2001**, *40*, 1274–1283.

(23) Hirst, J.; Wilcox, S. K.; Williams, P. A.; Blankenship, J.; Duncan, E.; McRee, D.; Goodin, D. B. *Biochemistry* **2001**, *40*, 1265–1273.

(24) Ivancich, A.; Jouve, H. M.; Sartor, B.; Gaillard, J. *Biochemistry* **1997**, *36*, 9356–9364.

(25) Ivancich, A.; Jouve, H. M.; Gaillard, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 12852–12853.

(26) Khindaria, A.; Aust, S. D. *Biochemistry* **1996**, *35*, 13107–13111.

(27) Tsai, A.; Wu, G.; Palmer, G.; Bambai, B.; Koehn, J. A.; Marshall, P. J.; Kulmacz, R. J. *Biol. Chem.* **1999**, *274*, 21695–21700.

(28) Shi, W.; Hoganson, C. W.; Espe, M.; Bender, C. J.; Babcock, G. T. *Biochemistry* **2000**, *39*, 4112–4121.

(29) (a) Un, S.; Atta, M.; Fontecave, M.; Rutherford, A. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 10713–10719. (b) Un, S.; Gerez, C.; Elleingand, E.; Fontecave, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 3048–3054.

(30) Un, S.; Tang, X.-S.; Diner, B. A. *Biochemistry* **1996**, *35*, 679–684.

(31) Ivancich, A.; Mattioli, T. A.; Un, S. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 5743–5753.

(32) Gerfen, G. J.; Bellew, B. F.; Un, S.; Bollinger, J. M.; Stubbe, J.; Griffin, R. G.; Singel, D. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 6420–6421.

(33) Fournel, A.; Gambarelli, S.; Guigliarelli, B.; More, C.; Asso, M.; Choteau, G.; Hille, R.; Bertrand, P. *J. Chem. Phys.* **1998**, *109*, 10905–10913.

(34) Dorlet, P.; Boussac, A.; Rutherford, A. W.; Un, S. *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103*, 10945–10954.

(35) Goodin, D. B.; McRee, D. E. *Biochemistry* **1993**, *32*, 3313–3324.

(36) Fitzgerald, M. M.; Churchill, M. J.; McRee, D. E.; Goodin, D. B. *Biochemistry* **1994**, *33*, 3807–3818.

(37) Nelson, D. P.; Kiesow, L. A. *Anal. Biochem.* **1972**, *49*, 474–478.



The crystals were irradiated with the  $\gamma$ -rays of a cobalt-60 source using a dose of 7 kGy/hr for 1 h at room temperature. Samples for HF-EPR measurements were prepared by finely grinding the crystals and homogenizing them in mineral oil. Samples were frozen in liquid N<sub>2</sub> for further use.

**EPR Spectroscopy.** The high-field EPR spectrometer has been described elsewhere.<sup>31</sup> The absolute error in  $g$ -values was  $1 \times 10^{-4}$ . The relative error in  $g$ -values between any two points of a given spectrum was  $5 \times 10^{-5}$ . Conventional 9 GHz EPR measurements were performed using a Bruker ER 200 spectrometer with a standard TE<sub>102</sub> cavity equipped with a liquid helium cryostat (Oxford Instrument), a microwave-frequency counter (Hewlett-Packard 5350B) and NMR gaussmeter (Bruker ER035M).

**Simulations of Exchange-Coupled Systems.** Calculations were based on the Hamiltonian given in the theory section. Preliminary simulations to obtain an estimation of the coupling parameters were carried out by using the effective  $g$ -values that were obtained by perturbation theory (see theory section). In this case, variable parameters were estimated by nonlinear minimization of the root-mean-square difference between the calculated and experimental spectra using a standard conjugate gradient method.<sup>38</sup> Full calculations were processed by incrementing the magnetic field value. For each field value, the Hamiltonian matrix was calculated and numerically diagonalized to obtain the eigenvalues and eigenvectors. Transition probabilities among all possible combinations of levels were calculated and summed. The powder spectra were obtained by calculating the resonance for 10<sup>6</sup> random orientations of the applied magnetic field with respect to the  $g$ -axes system. The resulting orientation-integrated spectrum was convoluted with a derivative Gaussian line shape having a suitable line width. In the case of the full calculation, the simulated spectra were manually scaled to the experimental data. Gaussian distributions were obtained by the method of normal deviates.<sup>38</sup> All of the calculations were performed on a Digital Equipment Corporation workstation by using local programs written in Fortran 77.

**Simulations of the Tyrosyl Radical Spectra.** The simulations of the HF-EPR powder spectra of tyrosyl radicals were simulated by using locally written Fortran programs with standard numerical routines.<sup>39</sup> Distribution in  $g$ -values were simulated by introducing a tensor, the principal axes of which were collinear with the  $g$ -tensor. The principal values of the broadening tensor were the widths of Gaussian distributions along three directions.

**Theory.** The Hamiltonian that describes the interacting system of a spin  $S = 1$  ( $S^{\text{Fe}}$ ) with a spin  $S = 1/2$  ( $S^{\text{rad}}$ ) is given by

$$\mathbf{H} = \beta \mathbf{S}^{\text{rad}} \cdot \mathbf{g}^{\text{rad}} \cdot \mathbf{H} + \beta \mathbf{S}^{\text{Fe}} \cdot \mathbf{g}^{\text{Fe}} \cdot \mathbf{H} + \mathbf{S}^{\text{Fe}} \cdot \mathbf{D} \cdot \mathbf{S}^{\text{Fe}} + \mathbf{S}^{\text{rad}} \cdot \mathbf{\Delta} \cdot \mathbf{S}^{\text{Fe}}$$

where  $\beta$  is the Bohr magneton;  $\mathbf{H}$ , the applied magnetic field;  $\mathbf{g}^{\text{rad}}$  and  $\mathbf{g}^{\text{Fe}}$  are the  $g$ -tensors for the radical and the iron center;  $\mathbf{D}$  is the zero-field splitting tensor for the iron and is assumed to be axial;  $\mathbf{\Delta}$  is the interaction tensor; and  $\mathbf{S}^{\text{rad}}$  and  $\mathbf{S}^{\text{Fe}}$ , the spin operators. The tensors were assumed to be diagonal and collinear. The  $z$  direction is taken along the axis of symmetry of the zero-field splitting. Furthermore, we assume that  $\mathbf{\Delta}$  is diagonal. With this assumption, the Hamiltonian can be expanded as follows in the system of axis chosen.

$$\mathbf{H} = \beta(g_x^{\text{rad}} \hat{S}_x^{\text{rad}} H_x + g_y^{\text{rad}} \hat{S}_y^{\text{rad}} H_y + g_z^{\text{rad}} \hat{S}_z^{\text{rad}} H_z + g_x^{\text{Fe}} \hat{S}_x^{\text{Fe}} H_x + g_y^{\text{Fe}} \hat{S}_y^{\text{Fe}} H_y + g_z^{\text{Fe}} \hat{S}_z^{\text{Fe}} H_z) + D(\hat{S}_z^{\text{Fe}} \hat{S}_z^{\text{Fe}} - \frac{2}{3}) + \Delta_x(\hat{S}_x^{\text{rad}} \hat{S}_x^{\text{Fe}}) + \Delta_y(\hat{S}_y^{\text{rad}} \hat{S}_y^{\text{Fe}}) + \Delta_z(\hat{S}_z^{\text{rad}} \hat{S}_z^{\text{Fe}}) \quad (1)$$

The interaction between the iron center and the radical results in six energy levels. Because the values for the coupling are small compared to the positive zero-field splitting parameter  $D$ , the EPR spectra arise predominantly from transitions between the two lower levels. These levels result from the coupling of the  $m_S = 0$  level of the iron with the  $m_S = +1/2$  and  $m_S = -1/2$  levels of the radical.<sup>19</sup> Perturbation theory

can be used to show that the resulting spectrum for the coupled species can be described as a powder pattern with effective  $g$ -values depending on the interaction and zero-field splitting parameters. The Hamiltonian is split into  $H^0$  and a perturbing term as follows:

$$\hat{H}^0 = \beta(g_x^{\text{rad}} \hat{S}_x^{\text{rad}} H_x + g_y^{\text{rad}} \hat{S}_y^{\text{rad}} H_y + g_z^{\text{rad}} \hat{S}_z^{\text{rad}} H_z) + \beta g_z^{\text{Fe}} \hat{S}_z^{\text{Fe}} H_z + D(\hat{S}_z^{\text{Fe}2} - \frac{2}{3})$$

$$\hat{H}^p = \beta(g_x^{\text{Fe}} \hat{S}_x^{\text{Fe}} H_x + g_y^{\text{Fe}} \hat{S}_y^{\text{Fe}} H_y) + \Delta_x \hat{S}_x^{\text{Fe}} \hat{S}_x^{\text{rad}} + \Delta_y \hat{S}_y^{\text{Fe}} \hat{S}_y^{\text{rad}} + \Delta_z \hat{S}_z^{\text{Fe}} \hat{S}_z^{\text{rad}}$$

We consider only the energy levels which implicate the  $m_S = 0$  manifold of the metal center.

When the magnetic field is applied along the  $x$  direction, the energies to the second order of the two levels of interest are

$$E_1 = \frac{1}{2} \beta g_x^{\text{rad}} H_x - \frac{2}{3} D - \frac{1}{D} \left( \beta g_x^{\text{Fe}} H_x + \frac{\Delta_x}{2} \right)^2 + \frac{\Delta_y^2}{4} \frac{1}{\beta g_x^{\text{rad}} H_x - D}$$

$$E_2 = \frac{1}{2} \beta g_x^{\text{rad}} H_x - \frac{2}{3} D - \frac{1}{D} \left( \beta g_x^{\text{Fe}} H_x + \frac{\Delta_x}{2} \right)^2 + \frac{\Delta_y^2}{4} \frac{1}{\beta g_x^{\text{rad}} H_x + D}$$

and therefore,

$$h\nu = E_1 - E_2 = \beta g_x^{\text{eff}} H_x = \beta g_x^{\text{rad}} H_x - \frac{1}{D} (2\beta g_x^{\text{Fe}} H_x \Delta_x) + \frac{\Delta_y^2}{2} \frac{\beta g_x^{\text{rad}} H_x}{(\beta g_x^{\text{rad}} H_x)^2 - D^2}$$

In the case for which the Zeeman energy is small, as compared to the zero-field splitting, it follows that

$$g_x^{\text{eff}} = g_x^{\text{rad}} - 2g_x^{\text{Fe}} \frac{\Delta_x}{D} - \frac{1}{2} g_x^{\text{rad}} \frac{\Delta_y^2}{D^2} \quad (2)$$

In the same way, when the field is applied along the  $y$  direction, we have

$$g_y^{\text{eff}} = g_y^{\text{rad}} - 2g_y^{\text{Fe}} \frac{\Delta_y}{D} - \frac{1}{2} g_y^{\text{rad}} \frac{\Delta_x^2}{D^2} \quad (3)$$

When the magnetic field is applied along the  $z$  direction, the energies to second order are

$$E_1 = \frac{1}{2} \beta g_z^{\text{rad}} H_z - \frac{2}{3} D + \frac{(\Delta_x + \Delta_y)^2}{8} \frac{1}{\beta(g_z^{\text{rad}} - g_z^{\text{Fe}}) H_z - D} + \frac{(\Delta_x - \Delta_y)^2}{8} \frac{1}{\beta(g_z^{\text{rad}} + g_z^{\text{Fe}}) H_z - D}$$

$$E_2 = -\frac{1}{2} \beta g_z^{\text{rad}} H_z - \frac{2}{3} D + \frac{(\Delta_x + \Delta_y)^2}{8} \frac{1}{\beta(-g_z^{\text{rad}} + g_z^{\text{Fe}}) H_z - D} + \frac{(\Delta_x - \Delta_y)^2}{8} \frac{1}{\beta(g_z^{\text{rad}} + g_z^{\text{Fe}}) H_z + D}$$

therefore,

$$h\nu = E_1 - E_2 = \beta g_z^{\text{eff}} H_z$$

$$= \beta g_z^{\text{rad}} H_z - \frac{(\Delta_x - \Delta_y)^2}{4} \frac{(g_z^{\text{rad}} + g_z^{\text{Fe}}) \beta H_z}{[(g_z^{\text{rad}} + g_z^{\text{Fe}}) \beta H_z]^2 - D^2} + \frac{(\Delta_x + \Delta_y)^2}{4} \frac{(g_z^{\text{rad}} - g_z^{\text{Fe}}) \beta H_z}{[(g_z^{\text{rad}} - g_z^{\text{Fe}}) \beta H_z]^2 - D^2}$$

(38) Press, W. H.; Flannery, B. P.; Teukolsky, S. A.; Vetterling, W. T. *Numerical Recipes*; Cambridge University Press: New York, 1986.

(39) Dorlet, P.; Rutherford, A. W.; Un, S. *Biochemistry* **2000**, *39*, 7826–7834.

When the Zeeman term is small, as compared to the zero-field splitting, we have

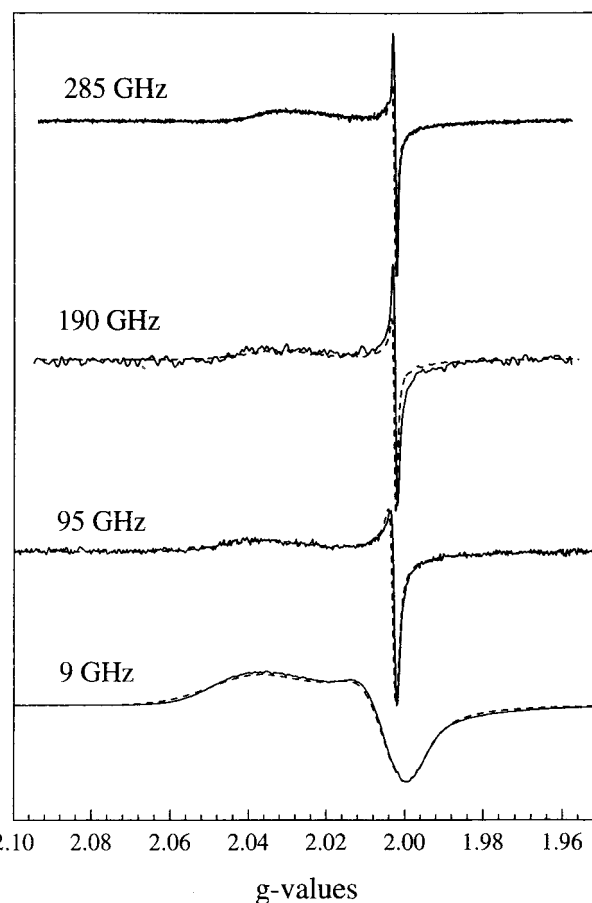
$$g_z^{\text{eff}} = g_z^{\text{rad}} - (g_z^{\text{rad}} + g_z^{\text{Fe}}) \left( \frac{\Delta_x - \Delta_y}{2D} \right)^2 - (g_z^{\text{rad}} - g_z^{\text{Fe}}) \left( \frac{\Delta_x + \Delta_y}{2D} \right)^2 \quad (4)$$

As can be seen from the equations giving the effective  $g$ -values, the EPR spectrum for the coupled species is independent of  $\Delta_z$ . Calculations based on the full diagonalization of the Hamiltonian verified the absence of  $\Delta_z$  dependence for the oxoferryl iron–tryptophanyl radical system. Therefore, only  $\Delta_x$  and  $\Delta_y$  can be determined from the experimental data, and the component of the interaction tensor along the zero-field splitting axis remains undetermined. A second observation is that the effective  $g$ -values depend on the ratio  $\Delta_i/D$  scaled by the  $g$ -values of the iron. In our simulations, the  $g$ -values for the radical and the iron were fixed to values reported in the literature.<sup>40,19</sup> The values obtained for the interaction parameters  $\Delta_x$  and  $\Delta_y$  are, therefore, relative to these values. For high magnetic fields, it is not possible to obtain the simple effective  $g$ -value expressions given in eqs 2–4, because the Zeeman terms are only modestly smaller than the parameter  $D$  in the case we study here. Hence, we expect a small but nonnegligible dependence on the magnetic field that can be used to further constrain the simulations.

## Results

**Multifrequency EPR Spectrum of the [(Fe(IV)=O) Trp<sup>•+</sup>] Intermediate of Wild-Type Cytochrome *c* Peroxidase: Spectral Simulations.** Figure 1 shows the 10 K EPR spectra of the compound **I** intermediate of wild-type cytochrome *c* peroxidase that were obtained at four different frequencies (9.5, 95, 190, and 285 GHz). The compound **I** sample, used to record all four of the spectra, was obtained in 15 s by the two-electron reaction of the high-spin ferric [Fe(III)] enzyme with hydrogen peroxide. Compound **I** has been previously assigned to a tryptophanyl radical in weak exchange interaction with the oxoferryl moiety.<sup>11–14,19</sup> The 9 GHz EPR spectrum has been previously modeled by an axial  $g$ -tensor, with effective values of  $g_{\perp} \cong 2.01$  and  $g_{\parallel} \cong 2.04$ , which results from a distributed exchange interaction ( $J$ ).<sup>19</sup> The broadening of the 9-GHz spectrum (Figure 1, bottom), as compared to those recorded at higher frequencies, is due to hyperfine couplings; however, at higher frequencies, the  $g$ -anisotropy dominates over the hyperfine couplings. The spectra taken at the four different frequencies scaled roughly with frequency. Small frequency shifts of the  $g_x^{\text{eff}}$  and  $g_y^{\text{eff}}$  values were observed.  $g_x^{\text{eff}}$  shifted by about  $-1 \times 10^{-2}$  from 95 to 285 GHz, and  $g_x^{\text{eff}}$ , by about  $-2 \times 10^{-3}$ .

We have simulated the compound **I** CcP spectra using the Hamiltonian given by eq 1 in the Theory Section. The parameter  $D$  has been estimated to be  $\sim 660$  GHz.<sup>9</sup> This value was fixed in the simulations. From perturbation analyses discussed above (see Theory Section), the effective  $g$ -values clearly depend on the ratio of the spin-coupling value to  $D$ . Therefore, the coupling values determined from the simulations were only unique for a given  $D$  value. The  $z$  axis corresponds to the zero-field splitting symmetry axis. Because of this axial symmetry, the choice of the directions  $x$  and  $y$  is free. These axes are chosen by inspection of the crystallographic structure.<sup>47a,b</sup> The plane of the indole ring for Trp191 is almost perpendicular to the heme



**Figure 1.** Multifrequency EPR spectra of the compound **I** intermediate [(Fe(IV)=O) Trp<sup>•+</sup>] of wild-type cytochrome *c* peroxidase. Spectra (1 scan) were recorded at 4 K and with a field modulation of 20 G. The simulated spectrum (dotted lines) is shown, together with the experimental spectrum for each frequency.

plane. The  $g_x$  direction of the organic radical, which, from theoretical considerations<sup>41a,b,c</sup> is assumed to go through the nitrogen atom of the ring, is parallel to the heme plane. Therefore, the  $x$  axis is chosen to coincide with the  $g_x$  direction of the radical and the  $y$  axis, to coincide with the  $g_z$  direction of the radical (indole ring perpendicular). The  $z$  axis matches, in good approximation, the  $g_y$  direction for the radical. In the ( $x$ ,  $y$ ,  $z$ ) axis system, the  $g$ -values for the oxoferryl moiety are  $g_x = g_y = 2.25$  and  $g_z = 1.98$ .<sup>9</sup> For the tryptophanyl radical, the  $g$ -values determined by high-field (35 GHz) EPR<sup>30</sup> are  $g_x = 2.0033$ ,  $g_y = 2.0024$ , and  $g_z = 2.0021$  (F. Lendzian, private communication). Therefore, in the system of axes chosen, we have  $g_x = 2.0033$ ,  $g_y = 2.0021$ , and  $g_z = 2.0024$ . The intrinsic  $g$ -values of the radical and the iron were fixed in the simulations.

The simulated spectra are shown in Figure 1 (dotted lines), together with the experimental data. The simulations accurately reproduce the frequency-dependent shifts of the effective  $g$ -values. To reproduce the large width of the  $g_x^{\text{eff}}$  edge, as well as the high field tail of the signal (which results from the breadth

(40) Bleifuss, G.; Potsch, S.; Hofbauer, W.; Graslund, A.; Lubitz, W.; Lassman, G.; Lendzian, F. **1998**, In *Magnetic Resonance and Related Phenomena*, Proceedings of the AMPERE-ISMAR International Conference, Vol. II, 879–880.

(41) (a) Stone, A. J. *Proc. R. Soc. London, Ser. A* **1963**, 271, 424–434. (b) Stone, A. J. *Mol. Phys.* **1963**, 6, 509–515. (c) Stone, A. J. *Mol. Phys.* **1964**, 7, 311–316.

(42) Hori, H.; Yonetani, T. *J. Biol. Chem.* **1985**, 260, 349–355.

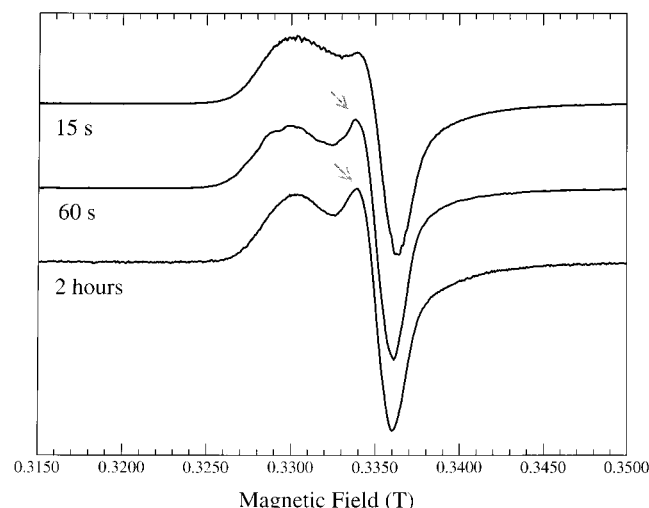
(43) Goodin, D. B.; Mauk, G.; Smith, M. J. *J. Biol. Chem.* **1987**, 262, 7719–7724.

(44) Fishel, L. A.; Farnum, M. F.; Mauro, J. M.; Miller, M. A.; Kraut, J. *Biochemistry* **1991**, 30, 1986–1996.

(45) It has been shown that the compound **I** intermediate has a  $t_{1/2}$  of  $6.6 \pm 1.4$  h (Erman & Yonetani, 1975).

(46) (a) Fasanella, E. L.; Gordy, W. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1969**, 62, 299–304. (b) Liming, F. G.; Gordy, W. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1968**, 794–780. (c) Mezzetti, A.; Maniero, A. L.; Brustolon, M.; Giacometti, G.; Brunel, L.-C. *J. Phys. Chem. A* **1999**, 103, 9636–9643.

(47) (a) Finzel, B. C.; Poulos, T. L.; Kraut, J. *J. Biol. Chem.* **1984**, 259, 13027–13036. (b) Edwards, S. L.; Xuong, N.; Hamlin, R. C.; Kraut, J. *Biochemistry* **1987**, 26, 1503–1511.

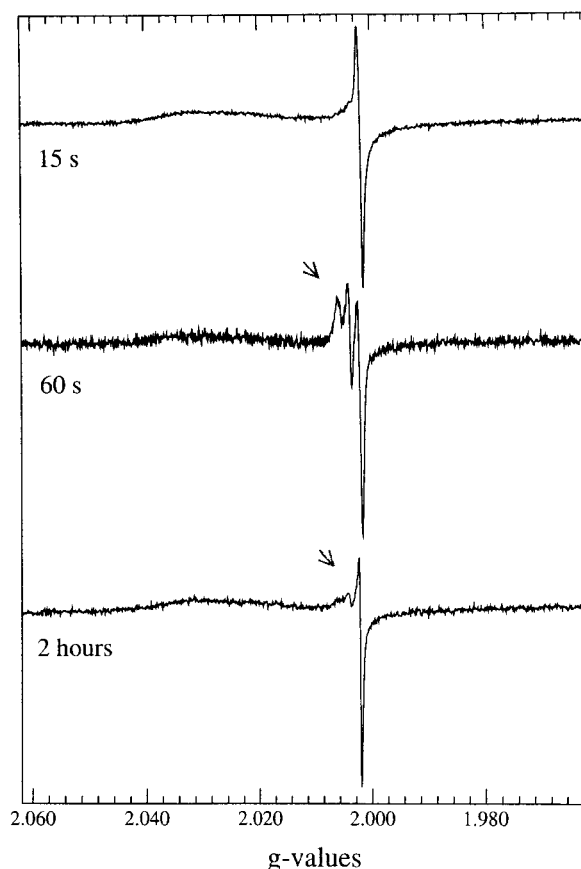


**Figure 2.** The 9-GHz EPR spectra of the  $[(\text{Fe(IV)=O)} \text{Trp}^{\bullet+}]$  intermediate of wild-type cytochrome *c* peroxidase obtained at different mixing times. The arrows indicate the minor differences between the spectra. Experimental conditions: temp, 4 K; microwave frequency, 9.437 GHz; modulation amplitude, 5 G; modulation frequency, 100 kHz; microwave power, 2 mW.

of the  $g_y^{\text{eff}}$  peak), it was necessary to use a distribution about the values of  $\Delta_x$  and  $\Delta_y$ , as already pointed out by Houseman and co-workers.<sup>19</sup> We modeled these distributions with Gaussian functions centered on  $\Delta_i$  and with a half-width at half-maximum of  $\sigma_i$ . The parameters obtained for the interaction are  $\Delta_x = -4.9$  GHz with a distribution  $\sigma_x = 1.5$  GHz and  $\Delta_y = -0.5$  GHz with a distribution  $\sigma_y = 3.5$  GHz. A larger distribution for  $\Delta_y$ , as compared to  $\Delta_x$ , was required in order to properly fit the high-field tail of the EPR spectrum, as well as the relative amplitude ratio of the main features of the spectrum.

**High-Field (285 GHz) EPR Spectrum of the  $[(\text{Fe(IV)=O)} \text{Trp}^{\bullet+}]$  Intermediate in Wild-Type Cytochrome *c* Peroxidase.** Three different compound **I** samples were obtained by mixing at 0 °C wild-type enzyme with equimolar hydrogen peroxide for 15 s, 60 s, and 2 h before freezing. The 9-GHz EPR spectra of the three wild-type compound **I** samples confirmed that the ferric heme iron of the native enzyme was fully oxidized for all three of the different mixing times (data not shown). The  $g \approx 2$  region of the 9-GHz EPR spectra showed the  $[(\text{Fe(IV)=O)} \text{Trp}^{\bullet+}]$  signal that was previously reported (Figure 2). In such spectra, the only noticeable difference between the compound **I** samples obtained at mixing times of 15 s and 60 s was the extra intensity contributing to the higher field region of the 9-GHz spectrum (arrows, Figure 2). The existence of such a narrow radical signal superposed to that of the exchange-coupled tryptophanyl radical has been a controversial issue in previous studies of the compound **I** in wild-type CcP and most of its mutants.<sup>42–44,19</sup>

Figure 3 shows the 285-GHz EPR spectra, recorded at 4 K, of the compound **I** samples obtained at mixing times of 15 s (top), 60 s (middle) and 2 h (bottom). The three spectra showed the EPR signal assigned to the exchange-coupled tryptophanyl radical (see previous section). Comparison of the HF-EPR spectra of the sample prepared with reaction times of 15 s and 60 s (Figure 3, top and middle) clearly shows that when the mixing time was increased to 60 s, a new EPR signal was superposed to that of the exchange-coupled tryptophanyl radical. Interestingly, after a longer reaction time (2 h) of the WT CcP with hydrogen peroxide in ice, the new EPR signal decreased considerably (Figure 2, bottom), but the tryptophanyl radical signal remained substantially unchanged.<sup>45</sup>

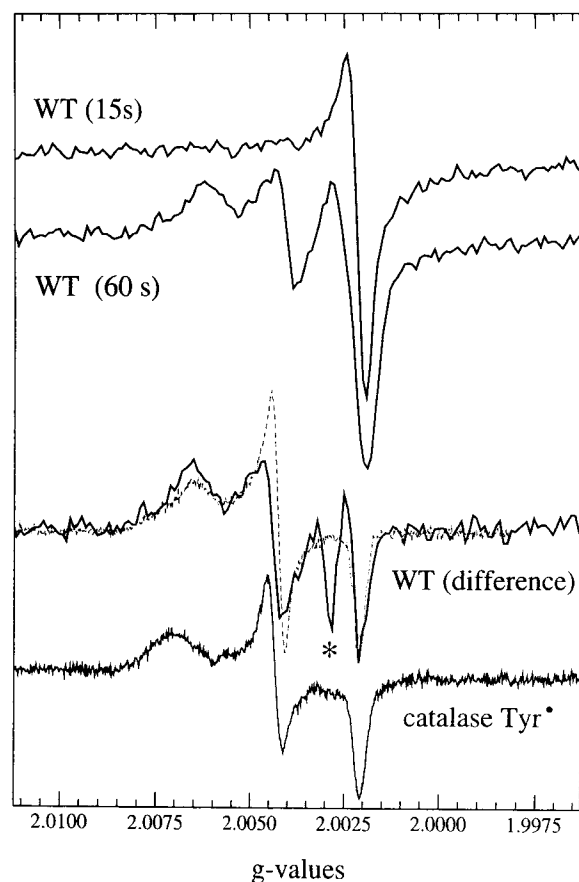


**Figure 3.** High-field (10 T, 285 GHz) EPR spectra of the  $[(\text{Fe(IV)=O)} \text{Trp}^{\bullet+}]$  intermediate of wild-type cytochrome *c* peroxidase obtained at different mixing times. The arrows indicate the presence of another radical species (see text). Spectra were recorded at 4 K using a field modulation of 20 G and a frequency modulation of 30 kHz.

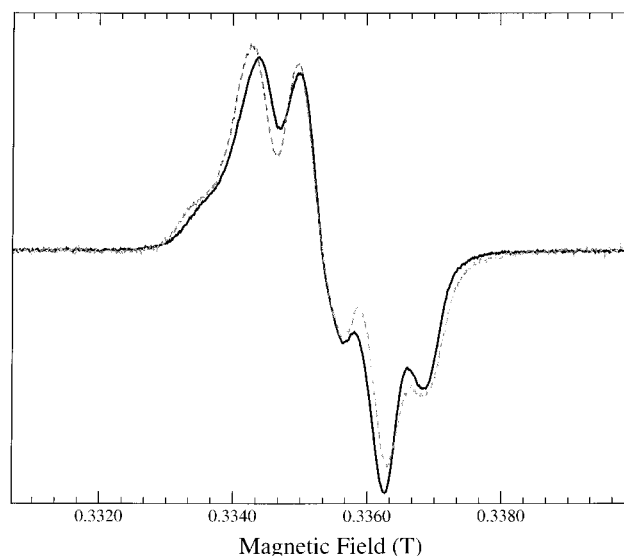
Figure 4, bottom, shows the spectrum that was obtained by subtracting the HF-EPR spectra of the wild-type CcP compound **I** obtained at 60-s and 15-s mixing times. The difference spectrum corresponds to the short-lived radical species formed for a mixing time of 60 s. The powder-pattern spectrum showed three main field positions with observed  $g$ -values of 2.00644, 2.00436, and 2.00208. The difference spectrum was very similar to the neutral tyrosyl radical spectrum of bovine liver catalase, including the broad  $g_x$ -edge (Figure 4, bottom). The additional resonance in the difference spectrum, for which the observed  $g$ -value is 2.00282, was a subtraction artifact (asterisk, Figure 4).

**Multifrequency EPR Spectra of the Compound **I** Intermediate in the W191G Mutant of Cytochrome *c* Peroxidase.** The W191G compound **I** was obtained by the 15-s reaction of the mutant CcP with equimolar hydrogen peroxide. Figure 5 shows the 9-GHz EPR spectrum of the compound **I** intermediate of the mutant CcP recorded at 80 K. Such spectrum overlaps well with the tyrosyl radical ( $\text{Tyr}^{\bullet_D}$ ) in Photosystem II (dotted lines). Thus, we assign the W191G compound **I** spectrum to a tyrosyl radical with the same proton hyperfine couplings as  $\text{Tyr}^{\bullet_D}$  (Table 1). The power saturation study on the CcP radical gave a  $P_{1/2}$  of 0.375 mW at 20 K, which is higher than that of the tyrosyl radicals in bovine liver catalase ( $P_{1/2} = 0.060$  mW at 20 K) and PSII. Spin quantification of the radical signal yielded  $\sim 0.2$  spins/heme.

HF-EPR was used to further characterize the radical intermediate formed in the W191G mutant CcP. Figure 6, middle, shows the HF-EPR spectra of the W191G compound **I** recorded



**Figure 4.** Expansion of the higher-field region of the  $[(\text{Fe(IV)=O)} \text{Trp}^{\bullet+}]$  intermediate spectra from Figure 3. The arithmetic difference between the 15-s and 60-s mixing time spectra (see text) is shown, together with the tyrosyl radical of bovine liver catalase.<sup>31</sup> The W191G compound **I** spectrum (gray dotted lines), recorded at 20 K and a field modulation of 5 G, is superposed onto the difference spectrum.



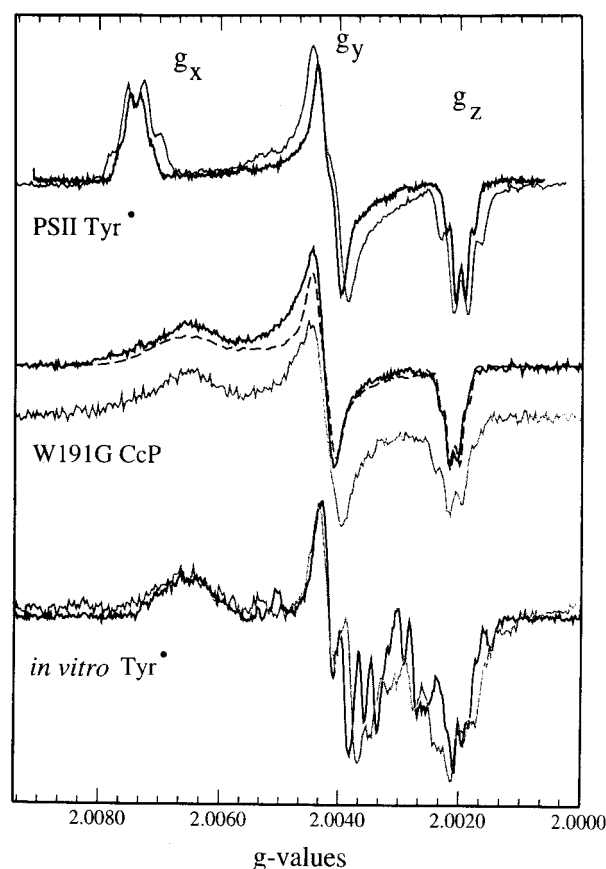
**Figure 5.** The 9-GHz EPR spectrum of the compound **I** intermediate of the W191G mutant cytochrome *c* peroxidase. The spectra of the tyrosyl radical in Photosystem II ( $\text{Tyr}^{\bullet\text{D}}$ ) is shown as a dotted line. Experimental conditions: temp, 80 K (10 K for  $\text{Tyr}^{\bullet\text{D}}$ ); microwave frequency, 9.441 GHz; modulation amplitude, 0.6 G (2.4 G for  $\text{Tyr}^{\bullet\text{D}}$ ); modulation frequency, 100 kHz; microwave power, 0.05 mW (2 mW for  $\text{Tyr}^{\bullet\text{D}}$ ).

at 190 and 285 GHz. The envelope of the HF-EPR spectrum is dominated by *g*-anisotropy, with resolved proton hyperfine

**Table 1.** Comparison of the *g* and Proton Hyperfine Coupling<sup>a</sup> Tensors of Compound **I** in the Mutant (W191G) Cytochrome *c* Peroxidase with the in Vitro and PSII Tyrosyl Radicals.

	in vitro $\text{Tyr}^{\bullet\text{HCl}}$ <sup>d</sup>	PSII $\text{Tyr}^{\bullet\text{D}}$ <sup>b</sup>	PSII $\text{Tyr}^{\bullet\text{D}}$ <sup>c</sup>	W191G CcP cpd <b>I</b> <sup>d</sup>
$g_x$	2.00658	2.00740	2.00756	2.00660
$g_y$	2.00404	2.00425	2.00432	2.00425
$g_z$	2.00208	2.00205	2.00215	2.00208
$\sigma_x$	0.00032		0.000036	0.00050
$\text{H}_{3,5} A_x$	-25.2	-25.4	-24.0	-24.0
$A_y$	-8.7	-7.2	-3.0	-3.0
$A_z$	-18.2	-19.5	-19.0	-19.0
$\phi_{3,5}$ , deg	22	23	26	26
$\text{H}_{2,6} A_x$	5.0	4.48	5.0	5.0
$A_y$	5.0	7.28	5.0	5.0
$A_z$	5.0	4.48	5.0	5.0
$\phi_{2,6}$ , deg	0	10	0	0
$\text{H}\beta_1 A_x$	39.2	20.2	31.0	31.0
$A_y$	39.2	29.3	28.0	28.0
$A_z$	39.2	20.2	27.0	27.0
$\text{H}\beta_2 A_x$	4.1	5.2	7.0	7.0
$A_y$	15.7	14.3	9.0	9.0
$A_z$	7.8	5.2	3.0	3.0

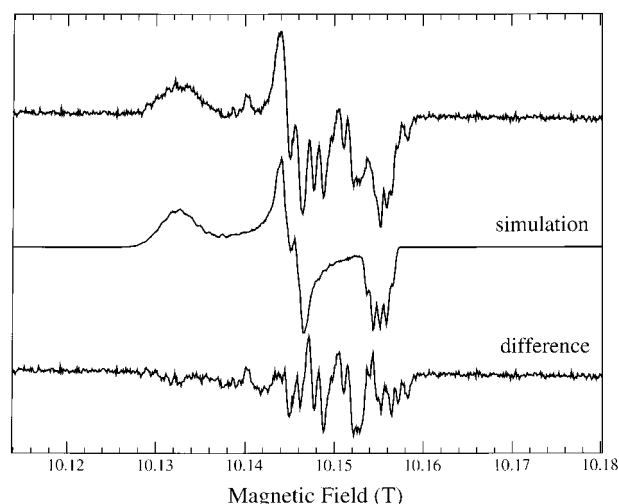
<sup>a</sup> MHz. <sup>b</sup> *Synechocystis* PSII: *g*-values from ref 30 and hyperfine couplings from refs 53, 54. <sup>c</sup> Spinach PSII from ref 39. <sup>d</sup> This work.



**Figure 6.** High-field 285 (solid black line) and 190 (solid gray line) GHz EPR spectra of the tyrosyl radicals in Photosystem II (top), the W191G mutant cytochrome *c* peroxidase (middle), and  $\gamma$ -irradiated Tyr-HCl crystals (bottom). The simulation of the 285 GHz spectrum of the CcP tyrosyl radical is superposed onto the experimental spectrum (dashed line). Spectra were recorded at 10 K, except for the CcP radical (20 K). In each case, the spectrum represents 1 scan and was obtained using a field modulation of 5 G (3 G for PSII).

coupling pattern mainly observed on the higher-field edge of the spectrum. The field positions of the three readily observed





**Figure 7.** Experimental (top) and simulated (middle) high-field EPR spectrum of the in vitro tyrosyl radical obtained by  $\gamma$  irradiation of Tyr-HCl crystals. The spectrum (1 scan) was recorded at 10 K using a microwave frequency of 284.56 GHz and a field modulation of 5 G. The crystals were finely ground and homogenized in mineral oil to avoid orientation of the tyrosyl radical with the magnetic field.

features of the W191G compound **I** radical spectrum agree well with the principal  $g$ -values of other tyrosyl radicals (Figure 6). Specifically, the  $g$ -values of the compound **I** radical are almost identical to those of the in vitro tyrosyl radical (Table 1), including the broad  $g_x$  component (Figure 6, bottom). Comparison of the 285 and 190 GHz-EPR spectra of the W191G compound **I**, both plotted in  $g$ -values (Figure 6, middle), showed that the width of the  $g_x$  component is invariant and is the result of a distribution in  $g$ -values, which is similar to that of the in vitro Tyr $^{\bullet}$  (Figure 2, bottom). By contrast, the broadening observed for the  $g_z$  component at the lower microwave frequency was purely due to hyperfine couplings (spin-spin interactions), as for the PSII Tyr $^{\bullet}_D$  (Figure 6, top).

The powder pattern spectrum of the W191G compound **I** could be best simulated with  $g$ -values of 2.00660, 2.00425, and 2.00208 for  $g_x$ ,  $g_y$ , and  $g_z$  respectively, and using the same hyperfine couplings of the PSII Tyr $^{\bullet}_D$  (see ref 39 and references therein). A distribution in  $g_x$ -values (with a Gaussian width of 0.0005) was needed to reproduce the broad low-field edge of the spectrum. The parameters used in the simulations are shown in Table 1, and the simulation is superposed to the experimental spectrum (dashed lines in Figure 6, middle).

#### High-Field EPR Spectrum of the In Vitro Tyrosyl Radical.

Tyrosyl radicals can be obtained in vitro by  $\gamma$ -irradiation of tyrosine crystals. The HF-EPR spectrum, recorded at 285 and 190 GHz, of the in vitro tyrosyl radical (Tyr $^{\bullet}_{HCl}$ ) is shown in Figure 6, bottom. As expected, the powder spectrum was dominated by  $g$ -anisotropy with a resolved hyperfine pattern. The parameters used for the simulation of the HF-EPR spectrum (Figure 7, middle) are shown in Table 1. A distribution in  $g_x$ -values was needed to reproduce the broad low-field edge of the experimental spectrum. The HF-EPR spectrum showed that at least one other radical species was formed, together with the Tyr $^{\bullet}_{HCl}$ . The EPR signal of such radical(s) mostly contributes at field positions between the  $g_y$  and  $g_z$  of the Tyr $^{\bullet}_{HCl}$  spectrum, as shown by the difference between the experimental and the simulated spectra (Figure 7, bottom). Longer exposures of the crystals to  $\gamma$ -irradiation gave a HF-EPR spectrum with an increasing proportion of other radical species relative to the Tyr $^{\bullet}_{HCl}$  (Supporting Information). The simultaneous formation of other radical species in the irradiated tyrosine crystals was

not completely unexpected and has been reported previously.<sup>46a,c</sup> Although the original work on irradiated single crystals did not detect phenoxy-ring hydrogen addition products, they are known to occur in polycrystalline samples.<sup>46a,b</sup> Such species have a protonated phenoxy oxygen and lost aromaticity. The reduced  $g$ -anisotropy of the contaminating radical, as compared with the tyrosyl radical seen in the difference spectrum in Figure 7, is consistent with the loss of spin on the oxygen atom as a result of protonation.<sup>29a</sup> Even in the presence of the contaminating radical signal, it is possible to identify the likely  $g_y$  and  $g_z$  features of the Tyr $^{\bullet}_{HCl}$  on the basis of the relatively large library of HF-EPR spectra of tyrosyl radicals.<sup>29–32</sup> These features are much less sensitive to their environment.

## Discussion

**HF-EPR Spectrum of the (Fe(IV)=O) Trp $^{\bullet+}$  Intermediate in Wild-Type Cytochrome *c* Peroxidase.** In contrast to a previous study,<sup>19</sup> we chose to model the interaction by a generalized spin-interaction Hamiltonian represented by a diagonal tensor, the principal axes of which are collinear with the  $g$ -tensors. Such interaction leads to a set of three effective  $g$ -values given by eqs 2–4. These expressions were rigorously expanded in terms of the different  $g_i$  and  $\Delta_i$  (where  $i$  denotes the  $x$ ,  $y$ , and  $z$  components) because of the higher resolution of high-field EPR with respect to  $g$ -anisotropy. However, it is clear that the spectra in Figure 1 cannot be characterized exactly by a single effective  $g$ -tensor. In contrast to the results predicted by perturbation theory, the turning points of the experimental spectra were field-dependent. A full Hamiltonian treatment was required to reproduce this behavior. Such an observation was made possible only by a multifrequency high-field EPR approach, where the effective  $g$ -anisotropy was dominant over the hyperfine interaction (Figure 1). In addition, as in the earlier work by Houseman,<sup>19</sup> distributions about the values  $\Delta_x$  and  $\Delta_y$  were required in order to properly fit the line shape of the EPR spectrum.

The description of the magnetic state for compound **I** by a weak interaction between the oxoferryl species and the tryptophanyl radical was first proposed by Houseman and co-workers (ref 19 and references therein). Their model was able to properly account for the apparently abnormal EPR signal observed for this state; however the values they obtained for the interaction components differ from ours. This is most likely the result of a difference in the modeling of the interaction. Houseman and co-workers have chosen to use a sum of isotropic exchange terms,  $-JS^{\text{Fe}} \cdot S^{\text{rad}}$ . In this representation, they obtained two contributions: two-third of the population exhibits an antiferromagnetic coupling centered at  $-1.45$  GHz and with a distribution width of 1.2 GHz, and the remainder third of the population exhibits a ferromagnetic coupling centered at  $+2.9$  GHz with a distribution width of 0.6 GHz. The authors note that the EPR spectra can be equally well-reproduced by a Heisenberg Hamiltonian with  $J$  described as a sum of three terms, as compared with the use of a spin-coupling tensor.<sup>19</sup>

The fundamental difference between the two models is that Houseman and co-workers assume a purely isotropic spin-spin interaction, whereas in the present work, an anisotropic interaction is used. The anisotropic model has two contributions, the isotropic component due to Heisenberg exchange and an anisotropic component due to dipolar coupling. In principle, it is possible to obtain the isotropic component of the anisotropic interaction by calculating the trace of the tensor; however, as discussed above, the spectra are to the second order independent of the  $z$  component of the spin-coupling tensor, and therefore,

**Table 2.** Environment of Candidates for the Tyrosyl Radical Site in the W191G Mutant Cytochrome *c* Peroxidase.

Tyr position	Tyr251	Tyr244	Tyr187	Tyr153	Tyr236
H $\beta$ dihedral angle, deg	67	66.4	3.7	0.7	82.5
O <sub>Tyr</sub> –Fe dist, Å	16.7	14.0	11.6	11.8	18.9
H bond donor(s)	Asp261	water 328	waters 345, 346	none	none
H bond dist, Å	1.62	1.66	1.9, 2.3		
Lys residue	Lys257	Lys243	Lys149	Lys149	Lys
NH <sub>Lys</sub> –O <sub>Tyr</sub> dist, Å	4.3	7.5	7.0	5.5	13.0
Arg residue	Arg166	Arg155	none	Arg160	none
NH <sub>Arg</sub> –O <sub>Tyr</sub> dist, Å	3.8	4.3		7.0	

in general it is not possible to directly determine the trace. The fact that the component of the interaction along the *y* axis is essentially zero leads to the conclusion that the dipolar and exchange contributions exactly cancel along this direction. If we assume a point–dipole model, the dipole–dipole vector can be oriented in one of three possibilities (i.e., along *x*, *y*, or *z*). However, only the case in which the dipolar vector is along *x* yields parameters that are consistent with the values obtained for  $\Delta_x$  and  $\Delta_y$  as well as the necessary requirement that the dipole coupling coefficient ( $\delta = \mu^0 g^{\text{Fe}} g^{\text{rad}} \beta^2 / 4\pi r^3$ ) be a positive value. This leads to  $\Delta_x = J - 2\delta$  and  $\Delta_y = J + \delta$ , and values can therefore be calculated for *J* and  $\delta$ . Using this approximation, the exchange coupling *J* is  $-2.3$  GHz, which is comparable to the value obtained by Houseman and co-workers for the antiferromagnetic contribution ( $-1.45$  GHz<sup>19</sup>). The dipole coupling value,  $1.8$  GHz, yields a spin–spin distance of  $3.1$  Å, which is inconsistent with the crystal structure<sup>47a</sup> ( $7.1$  Å from iron to indole nitrogen).<sup>48</sup> The discrepancy is probably due to the inadequacy of the point–dipole approximation for calculating distances in such cases, rather than the assumption of collinearity of the dipole vector with the *g*-axis. The crystallographic structure suggests that the dipole vector is rotated in the *xz* plane of the *g*-tensor and is not collinear with either axis. Preliminary calculations using a rotated interaction tensor that is consistent with the structure did not yield better fits or significantly weaker couplings.

One way to distinguish between the purely isotropic and anisotropic models is to examine single-crystal data. For an anisotropic interaction, the EPR spectrum of a single crystal sample is predicted to be a single line. In contrast, when the coupling is a sum of two isotropic contributions, the EPR spectra is constituted by two lines; that is, each contribution gives rise to a single line. Indeed, only one component was found during the analysis of the single crystal data, but measurements done on a polycrystalline sample gave essentially the same results as in frozen solution.<sup>19</sup> This is fully consistent with a single interaction tensor and supports our modeling of the spin–coupling interaction, as compared to a sum of isotropic terms. In this regard, because the shifts of the *g*-values,  $g_x^{\text{eff}} - g_x^{\text{rad}}$  and  $g_y^{\text{eff}} - g_y^{\text{rad}}$ , induced by the interaction are different, it follows that the interaction in this case must have anisotropic character. A single essentially isotropic interaction is unable to account for the observed experimental spectra.

**Tyrosyl Radical Intermediate in W191G Cytochrome *c* Peroxidase.** The HF-EPR spectrum of the in vitro tyrosyl radical confirmed the previously reported *g*-values.<sup>46a</sup> In particular, the

low  $g_x$ -value (2.00658) can be directly correlated to an electrostatic effect (electropositive) of the environment on the tyrosyl radical.<sup>29a,b</sup> Additional information concerning the microenvironment of the Tyr<sup>•</sup><sub>HCl</sub> was also obtained from the HF-EPR spectrum. The broad  $g_x$ -value is indicative of an inhomogeneous environment, similar to that of the tyrosyl radicals in Photosystem II (Tyr<sup>•</sup><sub>Z</sub>)<sup>30</sup> and bovine liver catalase<sup>31</sup> (Figure 4).

We have used high-field EPR to characterize the peroxide intermediate of the CcP mutant in which Trp191 was replaced by a glycine residue. The powder-pattern spectrum of the W191G compound **I** could be best simulated with the same *g*-values as those of the in vitro tyrosyl radical. In contrast, the hyperfine couplings (observed both at conventional and higher fields) were the same as those of Tyr<sup>•</sup><sub>D</sub> in Photosystem II. From these observations, we conclude that the radical intermediate in the mutant CcP is a tyrosyl radical with the same *g*-tensor as the Tyr<sup>•</sup><sub>HCl</sub> and proton-hyperfine coupling tensor as PSII Tyr<sup>•</sup><sub>D</sub> (Table 1).

Taking into account the information regarding the electrostatic microenvironment of the tyrosyl radical obtained from the high-field EPR spectrum of the W191G compound **I**, we examined the three-dimensional structures of the 14 tyrosines in the mutant CcP.<sup>36</sup> Residues at positions 251, 244, 187, and 153 are good candidates for the radical site. Those tyrosines are on the proximal side and relatively close to the heme iron ( $<17$  Å). The low  $g_x$ -value of the in vitro tyrosyl radical is due to the effect of an electropositive environment, specifically to the presence of a strong hydrogen bond at a distance of  $1.60$  Å, and donated by the protonated carboxylic group of a neighboring tyrosine.<sup>49a</sup> Presumably, a positively charged residue could yield the same  $g_x$ -value.<sup>29b</sup> The distances to possible hydrogen-bond donors and positively charged amino acid residues related to the tyrosine residues in W191G CcP are given in Table 1. The combined effect of hydrogen bond(s) donor(s) and positive charges in the microenvironment of tyrosines 251, 244, and 187 would explain the low  $g_x$ -value (with maximum at 2.00660) and the broadening (distribution of 0.0005) observed for the tyrosyl radical of W191G compound **I**. Interestingly, the strong hydrogen bond formed by the carboxyl group of Asp261 ( $1.62$  Å) on Tyr251 would be equivalent in strength to that observed for the in vitro tyrosyl radical and would explain the almost identical *g*-values (Table 1). Alternatively, Tyr244 and Tyr187 are also interesting candidates because of the presence of structural water(s) at hydrogen-bonding distance(s) together with a close lysine. Finally, the dihedral angles ( $\theta$ ) related to the  $\beta$ -protons of tyrosines 251 and 244 obtained from the crystal structure<sup>36</sup> of the W191G mutant CcP are in good agreement with those estimated from the experimental hyperfine couplings.

In a previous study, Tyr236 was proposed as the radical site because of the covalent modification due to the reaction of the mutant CcP with hydrogen peroxide and 2-aminothiazole.<sup>50</sup> As shown in Table 2, Tyr236 is very isolated (no potential hydrogen bond donors or positively charged amino acid residues close by). Accordingly, the  $g_x$ -value of such a tyrosyl radical should be similar to that of the tyrosyl radical in ribonucleotide reductase<sup>29</sup> (2.00890) and, thus, inconsistent with that observed in this work (2.00660). The reaction of CcP with hydrogen peroxide and 2-aminothiazole was carried out at room temperature; thus, it is likely that the tyrosine residue previously identified (Tyr236)<sup>50</sup> became oxidized by intermolecular electron transfer from the compound **I** tyrosyl radical that was observed

(48) A similar situation has been encountered in the treatment of the coupling between the nonheme iron and a semiquinone radical in bacterial reaction centers in which the distance that is obtained from the anisotropic spin–spin interaction coupling is also underestimated by a factor of 3 (see Buter, W. F.; Calvo, R.; Fredkin, D. R.; Issacson, R. A.; Okamura, M. Y.; Feher, G. *Biophys. J.* **1984**, *45*, 947–973).

(49) Frey, M. N.; Koetzle, T. F.; Lehman, M. S.; Hamilton, W. C. *J. Chem. Phys.* **1973**, *58*, 2547–2556.

(50) Musah, R. A.; Goodin, D. B. *Biochemistry* **1997**, *36*, 11665–11674.

in this work. Further studies with mutants on these tyrosine residues could be helpful in discerning among the possible candidates for the radical site.

#### The "Narrow" EPR Signal in Wild-Type CcP Compound I

The observation of an additional "narrow" signal on the 9 GHz EPR spectrum of the compound **I** in wild-type CcP has been a controversial issue since the early report of Hori and Yonetani<sup>42</sup> on the single-crystal EPR studies performed at 3, 9, and 35 GHz. From such studies, the authors concluded that the narrow radical signal should originate from the oxidation of a protein residue that is different from the compound **I** radical species. Other authors also found an additional narrow radical signal in the 9 GHz EPR of compound **I** (frozen solution) present in lower concentrations (10–20%).<sup>43,42,51</sup> By contrast, relaxation measurements made by using pulsed EPR on the CcP compound **I** samples prepared by Hoffman and co-workers provided no evidence of an additional radical species.<sup>19</sup>

In all of these studies, the mixing time used to prepare the CcP compound **I** was not mentioned by the authors, with the exception of Fishel and co-workers.<sup>44</sup> In the latter, 1–1.5-fold excess of hydrogen peroxide was used to prepare the compound **I** samples using a mixing time of 1 min. For such experiments, the native enzyme concentration was 0.2–0.7 mM.<sup>44</sup> Hoffman and co-workers used native enzyme (about 1 mM) in 30–60% glycerol with 2–5-fold H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> excess, but the mixing time was not quoted.<sup>19</sup> These authors interpreted the presence of an additional narrow radical reported by Hori and Yonetani<sup>42</sup> or Goodin and co-workers<sup>43</sup> as the result of overoxidation in compound **I** samples that were not properly prepared or as a result of a subset of molecules for which the tryptophanyl radical was not magnetically coupled to the oxoferryl heme.

We have monitored the compound **I** formation by using HF-EPR and different mixing times. Our results show that the exchange-coupled tryptophanyl radical was readily formed within 15 s and was stable for at least 2 h at 0 °C. Another radical species was formed when using a mixing time of 1 min; it almost disappeared when the sample was incubated for 2 h. The higher resolution of *g*-anisotropy obtained at higher fields allowed us to clearly resolve two different radicals by their *g*-values (Figure 3). The previous observations concerning the presence of a narrow radical (see, for example, ref 44) were based on subtle differences in the EPR spectra at conventional fields (Figure 2).

The controversial EPR results concerning the narrow radical species previously reported by the different groups, as well as the importance of the mixing dynamics (mixing time, sample concentration, viscosity, temperature) can be rationalize by our

findings. Fishel and co-workers<sup>44</sup> observed the narrow radical species when spending 1 min to mix the native (WT) CcP with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Hoffman and co-workers, who did not specify the mixing time, used, in addition, 30 to 60% glycerol in their native CcP samples.<sup>19</sup> In the latter case, the glycerol made the native sample more viscous, thus changing the conditions of the reaction. Accordingly, the absence of the second radical species in such samples can be reasonably explained by the fact that the short-lived species had already vanished, as demonstrated by our experiments (Figure 3).

The HF-EPR spectrum of the short-lived radical in wild-type CcP is very similar to that of the tyrosyl radical observed for the W191G compound **I** (Figure 4). In both cases, they are formed in low concentration (10–20%). Moreover, the *g*-anisotropy (defined as  $\Delta g = |g_x - g_y|$ ) of the short-lived radical is too large (0.0046) for that of an uncoupled tryptophanyl radical ( $\Delta g = 0.0012$ ).<sup>40</sup> Thus, in agreement with previous suggestions, we propose that the short-lived species is a tyrosyl radical.<sup>52</sup> The essentially identical *g*-values and distribution in *g*<sub>x</sub>-value that were obtained from the HF-EPR spectra of the tyrosyl radicals in wild-type and W191G mutant CcP (Figure 4) strongly suggests an equivalent electropositive environment for both of the radicals. Accordingly, the good candidates for the radical site found in both enzymes are the three tyrosines at positions 251, 244, and 187 (Table 2). Site-directed mutagenesis on such tyrosine residues or on their microenvironment combined with HF-EPR spectroscopy is a powerful approach to discern among these possibilities.

**Acknowledgment.** We thank Dr. A. William Rutherford for his support of this work and Dr. C. Roselli and Prof. C. Houée-Levin (Laboratoire de Physico-Chimie des Rayonnements, Université Paris Sud, Orsay) for the use of the cobalt-60 source and stimulating discussions. Financial support was provided by the European Union HCM Research Network (Contract no. FMRX-CT98-0214, to A.I.), the Human Frontiers Science Organization (Contract no. RGO349), Region Ile-de-France (Contract Sesame) and CEA-Saclay, and by Grant GM41049 from the National Institutes of Health (to D.B.G.).

**Supporting Information Available:** HF-EPR spectra of the *in vitro* tyrosyl radical obtained with longer exposure times. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

JA0036514

(52) It is noteworthy that the HF-EPR spectrum of a tryptophanyl radical with very small *J* values could be virtually identical to that of a tyrosyl radical.

(53) Warncke, K.; Babcock, G. T.; McCracken, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 7332–7340.

(54) Tommos, C.; Madsen, C.; Styring, S.; Vermass, W. *Biochemistry* **1994**, *33*, 11805–11813.

(51) Scholes, C. P.; Liu, Y.; Fishel, L. A.; Farnum, M. F.; Mauro, J. M.; Kraut, J. *Isr. J. Chem.* **1989**, *29*, 88–92.

21306

v.2<sup>☺</sup>

## A High-Field EPR Tour of Radicals in Photosystems I and II

S. Un, P. Dorlet, and A. W. Rutherford

Section de Bioénergétique, CNRS URA 2096, CEA Saclay, Gif-sur-Yvette Cedex, France

Received June 29, 2001

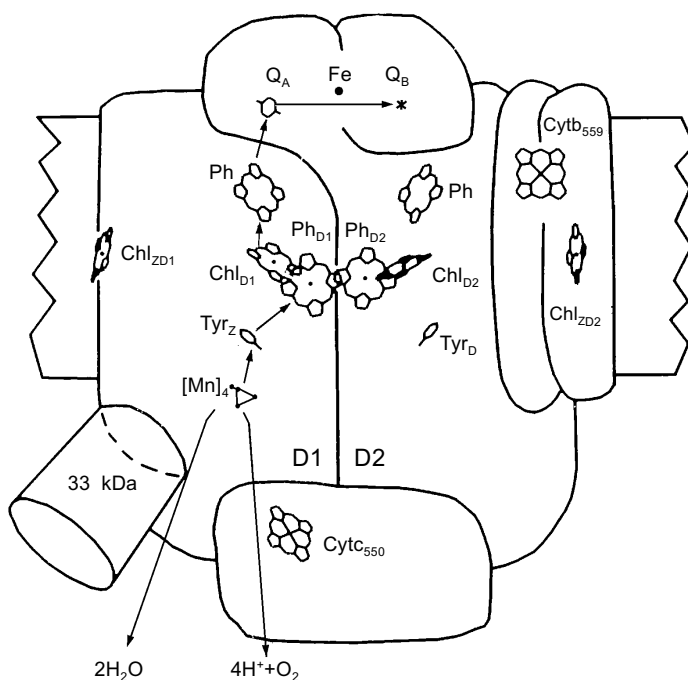
**Abstract.** High magnetic-field electron paramagnetic resonance (HFEPR) has been extensively applied to the study of photosynthetic reaction centers. HFEPR experiments have provided accurate measurements of  $g$ -values of radicals in Photosystems I and II. The  $g$ -values not only reflect the structure of the radical, but also its immediate environment. Hence, valuable information about radical-protein interactions can be obtained from  $g$ -values. Data on tyrosine-, quinone-, pheophytin- and chlorophyll-based radicals are reviewed. Experiments dealing with spin pairs in Photosystem I and II are examined. The spectrometer with which numerous experiments on photosystems have been carried out is described, as well as the 10 T magnet around which the spectrometer is based.

### 1 Introduction

One of the first biological applications of high-field electron paramagnetic resonance (HFEPR) has been in the study of photosynthetic reaction centers [1]. These complex redox proteins contain many different paramagnetic components and although they have been extensively studied by a wide range of methods, many questions remain concerning their structure and function. The reaction centers of oxygenic photosynthesis, Photosystems I and II (PSI and PSII, see Figs. 1 and 2) have proved to be particularly fertile grounds for research with HFEPR.

One of the principal advantages of HFEPR is the greater resolution in  $g$ -values. Figs. 3 and 4 show the conventional 9 GHz and HFEPR spectra of several radicals in PSII. While the lineshapes of the 9 GHz spectra are dominated by hyperfine interactions, the HFEPR spectra are dominated by  $g$ -anisotropy. This allows the  $g$ -values of these and other radicals to be measured with a high degree of accuracy with HFEPR. Even a qualitative comparison of the spectra in Fig. 4 shows that  $g$ -values of a radical are very sensitive to the molecular structure of the radical. Moreover, as we will discuss, the  $g$ -values are also very sensitive probes of the local electronic environment around the radical. Hence in proteins,  $g$ -values can be used to study radical-protein interactions, which often



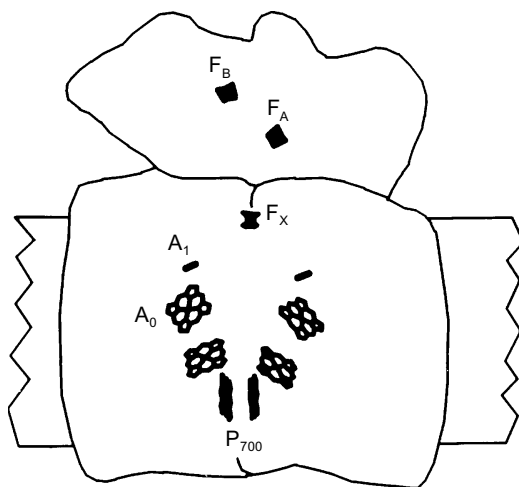


**Fig. 1.** Scheme of PSII on the basis of the 0.38 nm resolution crystallographic structure ([2], PDB code 1FE1) and showing the main cofactors components.

play an important role in determining chemical properties such as redox potentials. In this review we focus on the measurement of  $g$ -values of radicals in PSI and PSII and the nature of the information that has been obtained. Such information is especially valuable in that it complements the recently published crystallographic structures of PSII (current resolution 0.38 nm) [2] and PSI (resolution 0.25 nm) [3].

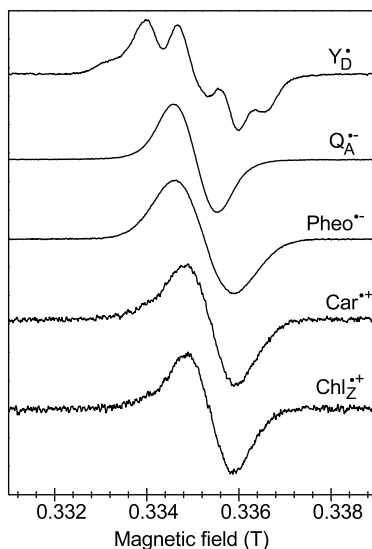
The theory of  $g$ -anisotropy of radicals was developed almost forty years ago [4–6] but has been only sporadically tested and applied owing to the paucity of reliable data. Protein-based radicals often provide better material than synthetic models for understanding  $g$ -values of organic radicals in general. Their diversity is quite remarkable [7], ranging from cofactors, such as quinones and chlorophylls, to amino acid radicals, such as tyrosines, tryptophans or even the glycy radicals found in ribonucleotide reductase (RNR) and pyruvate formate lyase. In addition, protein-based radicals are magnetically dilute and evolution has insured that the environment around the radical is structurally uniform. Finally, specific effects of the environment around the radical can also be studied using site-directed mutagenesis.

To supplement and better rationalize such physical biochemical studies of  $g$ -values, we and others have also investigated methods for calculating them [8–17]. Quantum mechanical calculations of magnetic resonance parameters, such as

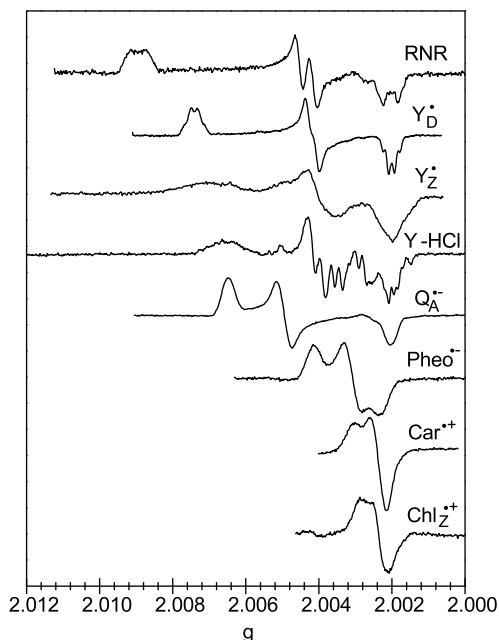


**Fig. 2.** Scheme of PSI on the basis of the 0.4 nm resolution crystallographic structure ([119, 120], PDB code 1C51).

chemical shifts and  $J$ -couplings in nuclear magnetic resonance (NMR) and hyperfine couplings in EPR, have not always been successful, especially on a quantitative level, and  $g$ -values calculations are not an exception. Recently, several sophisticated *ab initio* methods have been reported which hold much promise [10, 16]. Regardless of the quantitative accuracy of the calculated  $g$ -values, valuable



**Fig. 3.** 9 GHz EPR spectra of radicals in PSII.



**Fig. 4.** HFEPR spectra of radicals in PSII. The  $Y_Z^{\bullet}$  was obtained at 245 GHz, all other spectra were obtained at 285 GHz. The  $g$ -values for each radical are summarized in Table 1.

information can still be obtained regarding the orientation of the  $g$ -tensor and qualitative trends in values as a function of structure. It is beyond the scope of this review to discuss these calculations in detail. We will simply discuss the results of two methods which we have used: one on the basis of the semi-empirical MNDO implementation of Stone theory [8] and the ZORA method [18] which is part of the Amsterdam Density Functional calculation package [19–23]. It is our opinion that a more concerted effort between theoreticians and experimentalists will greatly improve this approach.

## 2 Spectrometer Description

Excellent reviews have been presented regarding the design of HFEPR spectrometers [24–28]. We briefly describe our spectrometer at CEA-Saclay. The spectrometer is based on the original design by Muller and coworkers [29] with several important improvements. Like the original design, the spectrometer does not use a cavity and hence has low sensitivity. Operationally, for organic radicals, the sensitivity is approximately that of a 9 GHz spectrometer. The microwave source is a 95 GHz synthesizer (ELVA-1, Saint-Petersburg, Russia) followed by a frequency doubler or tripler (Radiometer Physics, Meckenheim, Germany). The sample is contained either directly in a commercial 10 mm polycarbonate labo-

ratory test-tube or a standard 4 mm quartz EPR tube mounted inside the 10 mm test-tube. The sample is positioned inside the magnet by dropping it into the oversized circular waveguide. The sample comes to rest in the magnetically homogeneous portion of the superconducting magnet. The sample is retrieved by a helium gas-driven ejection mechanism similar to that used in NMR spectrometers. The complete process of sample loading and ejection can be carried out at 77 K and in darkness.

For biological samples, a resonator-less system offers certain advantages over traditional cavity-based designs. Loss in sensitivity in such spectrometer can be partially compensated for by using much larger sample volumes (0.1 to 1 ml) compared to cavity-based spectrometers ( $\sim 1 \mu\text{l}$ ). A large usable sample volume has other advantages such as the ability to introduce a field-calibration standard (see below) coaxially with the sample permitting very accurate  $g$ -value measurements. Sample handling in total darkness and at liquid nitrogen temperatures poses no problems. However, the most significant advantage is the ability to carry out complex biochemical sample manipulations such as redox poisoning directly with the large body of expertise that has been developed around producing biochemically well-characterized protein samples in standard 4 mm EPR tubes with 9 GHz EPR spectroscopy. Hence, the ability to use such 9 GHz EPR samples directly in HFEPR experiments provides important benefits of flexibility, continuity and a smooth transition to higher-field experiments

### 3 Magnetic Field Calibration and Standards

Accurate field calibration is required in order to exploit fully the increased resolution obtainable by HFEPR. Commercial superconducting magnet power supplies have provisions for measuring the current within the solenoid, and hence the magnetic field, to 20 parts per million, but, under operating conditions, the absolute accuracy is about five times worse. Like conventional 0.3 T spectrometers, the preferred method for magnetic field strength measurements is an NMR gaussmeter which runs in parallel with data acquisition. Such a system has been implemented at Massachusetts Institute of Technology [30]. Since the NMR gaussmeter normally requires liquid water as the sample, a clear disadvantage is operation at cryogenic temperatures at which most biological systems are studied. A simpler solution is the use of a  $g$ -standard, two of which, Mn(II) doped in magnesium oxide (Mn:MgO) ( $g = 2.00101$ ) [11] and Li metal dispersed in lithium fluoride (Li:LiF) ( $g = 2.002293$ ) [31], have been used. The use of Mn(II) has the important advantage that six hyperfine lines are observed, spread over a 600 G range providing convenient field markers over a magnetic field region where most radicals are observed and a means of accurately measuring the magnetic field sweep.

In the following, we focus on the use of the Mn(II) standard in characterizing the behavior of the single-coil solenoidal magnet (10.5 T Oxford Instruments, Oxon, England) employed in our spectrometer. Simulations on the basis of third-order perturbation approximation to the Mn(II) spin Hamiltonian [32] show that

**Table 1.** Summary of  $g$ -values of radicals found in PSI and PSII. Related radicals from other protein complexes and in vitro models as well as results from theoretical calculations are shown. ( $g_x - g_y$  values have been multiplied by  $10^4$ ). The number in parenthesis following the  $g_x$ -value is the Gaussian distribution half-width used in the simulation of the experimental data (this value is in units of  $g$  multiplied by  $10^4$ ).

	$g_x$	$g_y$	$g_z$	$g_x - g_z$	$g_{iso}$	Reference
Tyrosyl						
$Y_D^\bullet$						
Spinach	2.00756 (0.36)	2.00432	2.00215	54.1	2.00468	42
Spinach	2.00745	2.00422	2.00211	53.4	2.00459	8
<i>S. elongatus</i>	2.00767	2.00438	2.00219	54.8	2.00475	33
<i>Synechocystis</i>						
Wild type	2.00740	2.00422	2.00205	53.5	2.00466	43
D2-His189Gln	2.00832	2.00430	2.00220	61.2	2.00494	43
$Y_Z^\bullet$	2.00750 (7.0)	2.00422	2.00225	52.5	2.00466	43
<i>Synechocystis</i>						
D2-Tyr190Phe	2.00895	2.00438	2.00208	68.7	2.00514	60
RNR <i>E. coli</i>	2.00912	2.00457	2.00225	68.7	2.00531	112
Tyrosine HCl	2.00658 (3.2)	2.00404	2.00208	45.0	2.00423	46
N-acetyl-tyrosine	2.0092	—	—	—	—	45
Carotenoid						
$\beta$ -carotenoid						
Spinach	2.00322	2.00252	2.00211	11.1	2.00262	80
<i>S. lividus</i>	2.00335	2.00251	2.00227	10.8	2.00271	63
Canthaxanthin	2.0032	2.0023	2.0023	9	2.00260	81
3,7-decapentaene (ADF-ZORA)	2.00375	2.00264	2.00214	16.1	2.00284	80
Chlorophyll						
Spinach	2.00308	2.00253	2.00216	9.4	2.00259	80
Spinach	2.00304	2.00252	2.00213	9.1	2.00256	61
<i>S. lividus</i>	2.00311	2.00262	2.00201	11.0	2.00258	63
Extracted in $CH_2Cl_2$	2.00329	2.00275	2.00220	10.9	2.00275	62
Bchl <sub>a</sub>	2.00330	2.00260	2.00220	11.0	2.00270	11
$P_{685}^{\bullet+}$ ( <i>R. sph.</i> )	2.0033	2.0025	2.0021	12	2.0026	11
	2.00323	2.00241	2.00197	12.6	2.0026	68
Heterodimer	2.00299	2.00264	2.00229	7.0	2.00264	113
$P_{700}^{\bullet+}$ (PSI)						
40 K, pea	2.00317	2.00264	2.00226	9.1	2.00269	65
200 K, pea	2.00307	2.00260	2.00226	8.1	2.00264	65
RT, <i>S. lividus</i>	2.00304	2.00262	2.00232	7.2	2.00266	114
Pheophytin						
Spinach	2.00424	2.00316	2.00237	18.7	2.00326	42
<i>C. reinhardtii</i>						
Wild type	2.00420	2.00320	2.00236	18.4	2.00326	75
Glu130Leu	2.00440	2.00321	2.00243	19.7	2.00326	75
Bacteriopheophytin						
<i>R. viridis</i>	2.00437	2.00340	2.00239	19.8	2.00339	42
ADF-ZORA						
Charge at 0.183 nm	2.00448	2.00339	2.00227	22.1	2.00338	75
Charge at 1.60 nm	2.00488	2.00335	2.00235	25.3	2.00353	75
Quinones						
$Q_A^{\bullet-}$ (Spinach)	2.00610	2.00506	2.00215	39.5	2.00444	42
$Q_A^{\bullet-}$ ( <i>R. sph.</i> )	2.00660	2.00540	2.00220	33	2.00470	11

Table 1 (continued).

	$g_x$	$g_y$	$g_z$	$g_x - g_z$	$g_{\text{iso}}$	Reference
Vitamin K <sub>1</sub>						
A <sub>1</sub> (285 GHz)	2.00609	2.00503	2.00210	39.9	2.00441	this work
A <sub>1</sub> (95 GHz)	2.00622	2.00507	2.00218	40.4	2.00449	64
Ethanol	2.00556	2.00497	2.00219	33.7	2.00424	this work
Butanol	2.00588	2.00496	2.00225	36.3	2.00436	115
Isopropanol	2.00566	2.00493	2.00216	35.0	2.00425	11
MNDO						
Isolated	2.0060	2.0047	2.0022	38	2.00430	87
4 MeOH	2.0057	2.0046	2.0022	35	2.00420	87

the six lines which make up the spectrum should be equally spaced and with equal linewidth centered at the isotropic  $g$ -value, that is zero-field contributions are suppressed to at least second order and hyperfine contributions to third order at high magnetic fields. Experimentally, this is what is observed. The six lines are equally spaced and of equal linewidth to within the resolution of magnet current measurement ( $<0.5$  G). Hence, the linearity of the magnetic field sweep is limited by the resolution of the magnet power supply. In principle, this means one can calibrate the magnet to within 20 parts per million in magnetic field, 0.5 G or 0.00004 in  $g$ . This can be compared to the recently reported accuracy of 0.00001 in  $g$  at 95 GHz with a Li standard [33], although in this case the linearity of the magnetic field sweep was not addressed.

Experiments in which a single sample of the Mn:MgO standard was repeatedly measured indicated that the spectrum could be reproduced to within 1 G or 0.00008 in  $g$ . Under normal operating conditions for radicals, for modestly strong signals,  $g$ -values were found to be reproducible to this limit. It should be emphasized that relative field measurements, for example the important quantity  $g_x - g_z$  (Table 1) (where we use the convention  $g_x \geq g_y \geq g_z$ ), can be determined under optimal signal conditions to a higher accuracy that is only limited by the linearity of the magnetic field sweep. From a comparison of the data on tyrosine radicals (see below) for which multiple measurements by several different groups are available, it appears that the  $g_x - g_z$  quantity can be compared to at least  $1 \cdot 10^{-4}$  in  $g$ .

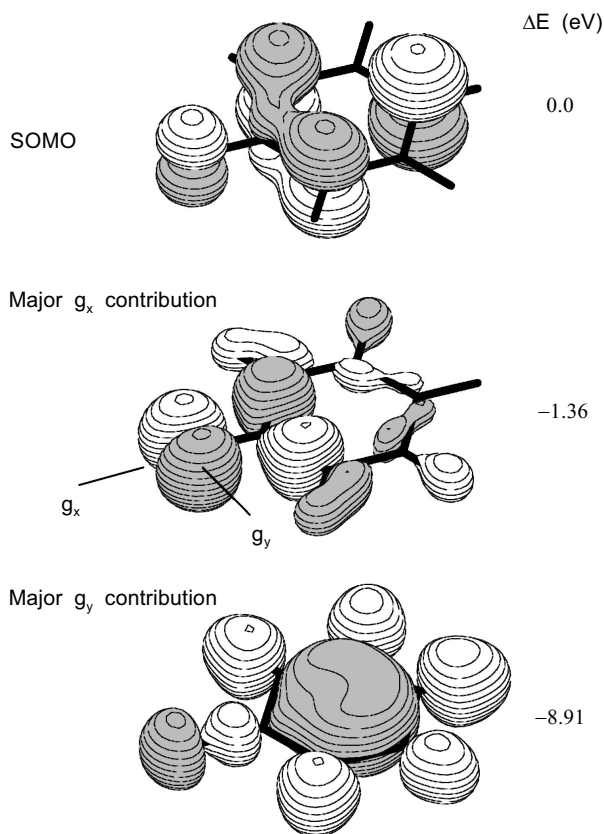
#### 4 Tyrosine Radicals

PSII contains two symmetry-related tyrosyl radicals (Fig. 1). One, known as  $Y_Z^\bullet$ , is formed transiently during the catalytic cycle and is directly involved in oxygen evolution. The other radical,  $Y_D^\bullet$ , is stable in the dark and its role within the photosystem is uncertain. It was the second stable protein tyrosyl radical discovered [34–36]. The first was the radical found in RNR [37, 38]. The earliest HFEPR study on PSII was carried out by Hoff and coworkers [39] in which

they reported the spectrum of  $Y_D^\bullet$  at 135 GHz. The spectra were obtained under fast passage conditions and exhibited a nonderivative absorption line shape. This work was followed by a study from our group [40] with the 245 GHz spectrometer at the Grenoble High Magnetic Field Laboratory. The low-temperature spectra exhibited the usual derivative line shape. However, the shape of resonance was not ideal and appeared to be linked to the spin state of the manganese cluster. Another study, carried out at 140 GHz, reported the pseudo-modulated saturated dispersion EPR spectrum of  $Y_D^\bullet$  [41]. More recently, higher-quality spectra have been obtained for this radical [33, 42]. The 285 GHz study of the powder spectrum has demonstrated that it is possible to obtain distortion-free hyperfine resolved spectra even at low temperatures (Fig. 4). The first HFEPR single-crystal study of  $Y_D^\bullet$  has been recently reported showing the potential of coupling high sensitivity of HFEPR with single crystals to obtain structural information [33].

At the early stages of HFEPR studies on tyrosyl radicals, it appeared that the  $g$ -values were protein or system specific (see Table 1). The  $Y_D^\bullet$   $g$ -values were clearly different from those of the RNR radical, which also differed from the single-crystal  $g$ -values of the tyrosyl radical generated by  $g$ -irradiation of tyrosine hydrochloride crystals [8] (Fig. 4). Even before the use of HFEPR, it has long been appreciated that the  $g$ -values of semiquinones depended on a variety of factors including the local environment such as the polarity of the solvents used [12–15]. The physical basis for this dependence is apparent from Stone's analysis of the  $g$ -values of semiquinones [4–6]. The dominant contribution to  $g$ -values for semiquinone radicals is the spin-orbit contribution which mixes the antibonding  $\pi^*$  ground-state with a low-lying nonbonding excited state in which the spin-density is localized in  $p_y$  and  $p_x$  oxygen orbitals (Fig. 5). Given the similarities between the molecular structure of semiquinone and tyrosyl radicals, it was reasonable to assume that the local electrostatic environment around the three tyrosyl radicals was the source of the differences in  $g$ -values [8]. In fact, the structure of the environment around the RNR and tyrosine hydrochloride radicals is known from X-ray crystallography. The former is in a hydrophobic pocket while the latter is strongly hydrogen-bonded. Consistent with experimental results, theoretical  $g$ -values obtained from MNDO calculations on the basis of Stone's theory were shown to depend on effects such as hydrogen bond and presence of point charges [8].

The first experimental study of the impact of the protein environment on the  $g$ -tensor of tyrosyl radicals was carried out by using mutants of PSII [43].  $Y_D^\bullet$  was proposed to be hydrogen-bonded to a neighboring histidine residue [35] and this was confirmed by 9 GHz EPR and electron nuclear double resonance (ENDOR) measurements on mutants [44]. HFEPR spectra of PSII in which this histidine was mutated to a glutamine clearly showed a shift in the  $g_x$ -value from 2.0075 to 2.0083 (Table 1) [43]. By comparison, the tyrosyl radical generated by  $\gamma$ -irradiation of molecular crystals of N-acetyltyrosine has a  $g_x$ -value of 2.0092 [45]. In this case, the radical is isolated with no hydrogen-bond donors or nearby ionic groups. The same  $g_x$ -value had been previously predicted by MNDO cal-



**Fig. 5.** Molecular orbitals which give the largest contribution to the spin-orbit coupling component of tyrosyl radicals  $g$ -anisotropy. The molecular orbitals and relative energies were calculated with the PM3-MNDO method.

culations [43]. By contrast, the  $\gamma$ -irradiation of tyrosine hydrochloride (see above) yields a strongly hydrogen-bonded radical with a value of 2.0066 [46]. Therefore, the shift in the  $g_x$ -value observed when the histidine is mutated to a glutamine was consistent with the reduction in the electropositive nature of the environment around  $Y_D^{\bullet}$ . The value of 2.0083 for the glutamine mutant clearly indicates that the radical still exists in an electropositive environment. This could arise from a weaker hydrogen bond from the glutamine residue or the presence of a second hydrogen bond donor.

A PSII mutant that lacks  $Y_D$  (replaced by a phenylalanine) was used to study the tyrosine Z radical ( $Y_Z^{\bullet}$ ) [43]. In intact systems,  $Y_Z^{\bullet}$  is short-lived, with a lifetime depending on the state of the manganese cluster [47]. In preparations where the cluster has been removed,  $Y_Z^{\bullet}$  can be trapped by freezing the sample under illumination in the presence of an exogenous electron acceptor. The 245 GHz spectrum of  $Y_Z^{\bullet}$  exhibited nearly identical  $g$ -values as those measured for  $Y_D^{\bullet}$ , with the



exception that the  $g_x$ -value was distributed (Fig. 4). The simplest explanation is that, on average,  $Y_Z^\bullet$  and  $Y_D^\bullet$  are hydrogen-bonded to the same extent but, in the case of  $Y_Z^\bullet$ , hydrogen-bond orientation and, therefore, the hydrogen-bond strength are distributed [43]. This is in agreement with other results from 9 GHz ENDOR and electron spin echo experiments [48–50]. In recent studies, the  $g_x$ -value of  $Y_Z^\bullet$  appears to be pH-dependent: at pH 9 (compared to pH 6 of the original study) the  $g_x$ -value for  $Y_Z^\bullet$  is lower than that for  $Y_D^\bullet$  with a value of 2.0068 [51].

There have been a number of other studies of tyrosyl radicals in various other protein. Of those radicals that are transient, all appear to exist in distributed electropositive environments (for example, see refs. 52–54). Conversely, those that are naturally stable, such as  $Y_D^\bullet$  in PSII and the tyrosyl radical of RNR, appear to exist in well-defined electrostatic environments. The tempting correlation is that the stability of the radical is coupled to the distributed environment. It is thought that a nearby base (and hydrogen-bond acceptor) is needed to facilitate the oxidation of a tyrosine residue [55–57]. Upon oxidation the hydrogen-bonding roles reverse with the tyrosyl radical becoming the acceptor. This role reversal would lead to a strained hydrogen-bonding geometry which either undergoes relaxation to yield a radical stabilized by a well-defined environment or remains strained and distributed to yield an unstable radical.

The only stable tyrosyl radical that we have measured that exists in a distributed environment is the one generated by  $\gamma$ -ray irradiation of tyrosine hydrochloride (Fig. 4) [46]. In this case, there is no such role reversal. The tyrosine molecule is a hydrogen-bond acceptor before and after oxidation. Upon oxidation, due to the tight crystal packing, the radical is trapped with no possibility of further reaction in a hydrogen-bond geometry of a reduced tyrosine molecule leading to a strained environment.

The effect of the local electronic environment on the  $g$ -values of tyrosyl radicals is through the modification of the energies of the excited states that are characterized by the nonbonding orbitals  $Y_D^\bullet$  localized on the phenolic oxygen (Fig. 5). Such energy changes affect the spin-orbit mixing of these low-lying excited states with the ground state leading to changes in the  $g$ -anisotropy [4–6]. EPR measurements with  $^{17}\text{O}$  labeling show that the ground state oxygen spin density on  $Y_D^\bullet$  (hydrogen-bonded) is only 10% different compared to the RNR tyrosyl radical (nonhydrogen-bonded) [58, 59]. Hence, the dominant effect is likely to be the change in the  $n \rightarrow \pi^*$  transition energy. Farrar and coworkers [41] have carried out hybrid Hartree-Fock density-functional calculations and have shown that methylphenoxy radical oxygen spin density can change by as much as 30% in response to hydrogen bonding if distances as short as 0.11 nm are considered for the hydrogen bond. At such short hydrogen-bonding distances (<0.16 nm) the energy of the nonbonding orbitals (Fig. 5) increases relative to the SOMO in response to increasing Coulombic repulsion [52] leading to a decrease in the spin-orbit contribution and an increase in  $g$ -anisotropy. For hydrogen-bonding distances relevant to most proteins (>0.16 nm), all quantum mechanical calculations [8, 41] are consistent with experiments indicating an oxygen spin density change of no more than 10% upon hydrogen bonding.

Finally, it should be emphasized that sensitivity of tyrosyl  $g$ -values to local environment is exactly analogous to electrochromic shifts in optical and vibrational spectroscopies. However, the exact correlation between the HFEPR measurements and these other spectroscopies can be complex (for example, see ref. 52). Furthermore, the  $g$ -values are sensitive to all nearby electrostatic influences and not only to hydrogen bonds. This has been demonstrated by using mutants of RNR [60]. Neutral residues close to the tyrosine radical were changed to positively charged residues leading to small measurable shifts in the  $g_x$ -value. Such simple electrostatic-dependent shifts in  $g$ -values are predicted for any radicals that have significant spin-density on oxygen and nitrogen atoms (see below).

## 5 Chlorophylls

Chlorophyll cations are generated as a result of the first photochemical reaction in photosynthetic reaction centers. In PSII, a chlorophyll cation radical ( $\text{Chl}_a^{*+}$ ) (Fig. 1) can be generated as part of a secondary electron transfer pathway. Chlorophyll-a cation radicals ( $\text{Chl}_a^{*+}$ ) have been investigated by HFEPR. The  $g$ -anisotropy is only partially resolved even at 300 GHz [61, 62]. Greater resolution has been achieved with deuterated samples [62]. One reason for the reduced anisotropy compared to tyrosyl and semiquinone radicals is the greater extent of the unpaired electron delocalization. Another contribution may be from the interaction of the magnesium ion with the nonbonding nitrogen orbitals which would reduce the mixing by spin-orbit coupling of the ground state with excited states that are localized on these nonbonding orbitals. The  $g$ -values appear to be sensitive enough to the electronic structure to distinguish between  $\text{Chl}_a^{*+}$  and  $\text{BChl}_a^{*+}$  molecules (see Table 1). More interestingly, the  $\text{Chl}_a^{*+}$   $g$ -values in organic solvent are different from those in the protein, indicating that the environment can have a measurable influence on the  $g$ -values. The  $\text{Chl}_a^{*+}$   $g$ -values in *Synechococcus lividus* [63] PSII are different from those in spinach PSII and in organic solvent. The *Synechococcus lividus*  $g$ -anisotropy ( $g_x - g_z$ ) is larger than the others and is equal to that of  $\text{BChl}_a^{*+}$  radical and the  $g_z$ -value is the lowest of all the values reported for radicals in Table 1. Further investigation is required to understand the origins of these differences.

The HFEPR spectrum of the chlorophyll cationic species  $\text{P}_{680}^{*+}$ , the primary donor of PSII, has yet to be measured. The corresponding primary donor,  $\text{P}_{865}^{*+}$ , from *R. sphaeroides* bacterial reaction centers [11] and  $\text{P}_{700}^{*+}$  in PSI [64, 65] have been measured. Single-crystal measurements on  $\text{P}_{700}^{*+}$  [64] showed that the  $g_z$  direction is not ring-plane perpendicular, but rather  $37^\circ$  tilted. Similar tilts have been measured in mutants of *R. sphaeroides* in which the primary donor is composed of a  $\text{Bchl}_a$  and  $\text{Bpheo}$  pair with the radical centered on the  $\text{Bchl}_a$  moiety. Both INDO/SP [66] and ZINDO [62, 67] calculations predict a tilt but only of about  $10^\circ$ . It has been speculated that this tilt might be due to the orientation of the substituent groups, which, in both  $\text{P}_{865}^{*+}$  and  $\text{P}_{700}^{*+}$ , are able to affect the electron delocalization and, therefore, modify the  $g$ -tensor and its orientation. Zech

and coworkers [64] have proposed that interactions with the protein environment might also be important, since the tilt in the orientation is similar for an acetyl (BChl<sub>a</sub>) or a vinyl group (Chl<sub>a</sub>). However, it is not clear whether conjugation or environment interactions can translate to such a large angular deviation. Clearly, more detailed calculations are needed.

The  $P_{700}^{*+}$   $g$ -values at 40 K are very similar to the spinach PSII Chl<sub>a</sub><sup>+</sup> values with the exception of an isotropic shift of 0.0001. The most straightforward interpretation is that  $P_{700}^{*+}$  is a monomer chlorophyll radical [68], in agreement with extensive ENDOR and electron spin echo envelope modulation (ESEEM) studies [69–72]. However, the observation that  $P_{700}^{*+}$   $g$ -values are temperature-dependent indicates that a straight comparison of  $g$ -values is likely to be an oversimplification.

The  $g$ -anisotropy of  $P_{700}^{*+}$  exhibits a strong temperature dependence that has not been observed for any of the other reaction center radicals. The anisotropy decreased with increasing temperature. The dependence appeared to be nearly linear from 10 K to room temperature. One possible mechanism for the linear temperature dependence is mechanical compression/expansion. As  $P_{700}$  is a chlorophyll pair, energy levels of the pair will depend on the spacing between the ring system. Compression of the system would lead to destabilization of the SOMO due to unfavorable Coulombic interaction which would reduce the energy difference between the SOMO and nonbonding orbitals resulting in a smaller  $g$ -anisotropy. Isothermal compression experiments in pressured cells on bacterial reaction centers exhibit linear effects. For example, the  $Q_y$  optical transition of the primary electron donor in *R. sphaeroides*, located at 870 nm at atmospheric pressure, undergoes a linear red shift as a function of pressure from 0.05 to 0.2 GPa [73]. It is thought that the chlorophyll molecules of the special pair undergo significant distortions with increase in pressure. Unfortunately, since the  $P_{865}^{*+}$   $g$ -values do not exhibit any temperature dependence [68], the temperature dependence of the  $P_{700}^{*+}$   $g$ -values remains poorly understood.

## 6 Pheophytin

In PSII, the primary electron acceptor is a pheophytin-a molecule (Fig. 1). The pheophytin radical (Pheo<sup>•−</sup>) can be photoaccumulated under strongly reducing conditions by illuminating the preparation at 0°C [74]. In contrast to chlorophylls, pheophytin radicals have  $g$ -anisotropies which can be resolved at 300 GHz [42]. As with chlorophylls, the  $g$ -values are sufficiently sensitive to electronic structure so that pheophytin and bacteriopheophytin radicals can be distinguished. The larger  $g$ -anisotropy of the latter may be connected to presence of spin density on the acetyl group which is not present in the plant pheophytin. To test the extent of sensitivity of  $g$ -values, mutants which have been engineered to modify the hydrogen bonding to the ring-V carbonyl group were examined [75]. The hydrogen-bond donor, residue D1-E130, was replaced by a histidine, glutamine and leucine residue. In a manner very similar to tyrosyl radicals, the  $g_x$  values shifted to higher values with decreasing hydrogen bonding strength. This shift can be

rationalized in an identical manner to that of the tyrosyl radicals: hydrogen bonding results in an increase in the  $n \rightarrow \pi^*$  transition leading to a smaller spin-orbit contribution to the  $g$ -anisotropy. The basic trend is well-reproduced by theoretical ADF-ZORA  $g$ -value calculations [75]. These calculations also predict that the orientation is approximately parallel to ring-V carbonyl group. Unlike  $\text{Chl}_a^{*+}$ , the calculated  $g_z$  direction was found to be perpendicular to the ring plane.

## 7 Carotenoid

Within the PSII complex there are two  $\beta$ -carotene molecule, one of which can be oxidized to a radical cation. The EPR signal arising from the radical form of this molecule was observed over 25 years ago but was incorrectly assigned to a chlorophyll radical [76]. Hanley and coworkers [77] were able to make the correct assignment with optical spectroscopy in parallel to establish the presence of the  $\beta$ -carotenoid radical. Optical spectroscopy also suggested that low-temperature illumination of PSII only produced the  $\beta$ -carotenoid radical in vast number of centers and that, upon warming, electron transfer occurred from  $\text{Chl}_z$  to the  $\beta$ -carotenoid radical. To better characterize this alternate electron-transfer pathway ESEEM [78], ENDOR [79] and HFEPR [63, 80] have been used. Fallor and coworkers [80] observed that plant PSII samples illuminated at 5 K yielded partially resolved 5 K HFEPR resonance (Fig. 4) that could be fit with a single  $g$ -tensor. After the sample was incubated at 200 K, a new partially resolved signal corresponding to  $\text{Chl}_z^{*+}$  was observed (Fig. 4). This signal was identical to that observed by illuminating the sample directly at 200 K and had  $g$ -values obtained from simulations identical to previous measurements of  $\text{Chl}^{*+}$  radicals (see Table 1). A similar study by Lakshmi and coworkers [63] utilized both 130 GHz EPR and deuterated samples of *Synechococcus lividus*. Irrespective of illumination temperatures, resolved signals attributed to the carotenoid radical and  $\text{Chl}_z^{*+}$  were observed. Clearly more studies are required to clarify these contradictory results.

The  $g$ -values of the resonances assigned to the  $\beta$ -carotenoid radical were similar in both of the above studies, but different from the canthaxanthin radical [81]. This latter radical was found to exhibit an axial ( $g_x, g_y = g_z$ ) spectrum in comparison to the rhombic PSII radical. ZORA-ADF calculations of polyene radicals predicted rhombic  $g$ -tensors (see Table 1). As the canthaxanthin radical is produced on a reactive surface, it is possible that the reported  $g$ -values of this radical do not reflect the  $g$ -tensor of the isolated radical, but rather those of a radical that is strongly interacting with the surface.

## 8 Quinones

Quinones are the secondary electron acceptors in PSI (phylloquinone) and PSII (plastoquinone). Under normal conditions, the semiquinone radical in PSII,  $\text{Q}_A^{\bullet-}$ , is exchange coupled to the high-spin nonheme iron yielding a very broad signal at 9 GHz [82]. However, it is possible to uncouple the two species by different bio-

chemical treatments: pH 11 treatment [83], conversion of the high-spin form of the nonheme iron to the low-spin  $S = 0$  state by addition of cyanide [84], substitution by zinc [85], and removal of the nonheme iron [86]. In these treated preparations, the direct observation of the semiquinone radical EPR signal is possible by addition of dithionite in the dark. The HFEPR spectrum exhibits a clearly resolved  $g$ -tensor without any hyperfine resolution [42]. The  $g$ -values are consistent with a strongly hydrogen-bonded radical [11, 87]. A small shift of  $-1 \cdot 10^{-4}$  in  $g$  has been observed when the pH is reduced from 9.0 to 5.5 [51]. This indicates that the environment becomes increasingly electropositive possibly due to increase in hydrogen bonding or appearance of a distant cationic group. These observations are consistent with previous ESEEM studies [88] and similar to those of Burghaus and coworkers [11] on  $Q_A^{\bullet-}$  in bacterial reaction centers.

The photoaccumulated phylloquinone (vitamin  $K_1$ ) radical in PSI, known as  $A_1$ , has also been measured [64]. In vitro models in alkaline alcohol solutions have also been studied [11, 89]. The calculated MNDO  $g$ -values of the nathasemiquinone with 4 hydrogen bonds closely match those of the in vitro vitamin  $K_1$  models (Table 1). The  $g_x$ -value of the PSI radical is clearly greater than the models and is comparable to the isolated radical value predicted by the calculations. By contrast, 9 GHz ENDOR studies suggested that the PSI radical is hydrogen-bonded [90, 91]. This has recently been confirmed by the crystallographic structure [3]. Hence, some other interaction must account for the relatively high  $g_x$ -value. A proximal tryptophan residue was first identified by 9 GHz ESEEM measurements [92] and this was also confirmed by the crystallographic structure [3]. A  $\pi$ -stacking arrangement of this residue with the radical has been suggested [92, 93]. Such an interaction would strongly affect the  $\pi^*$  SOMO more than the excited states that carry unpaired spin density localized on oxygen nonbonding orbital since these orbitals extend perpendicularly to  $\pi$ -stacking direction. If the  $\pi$ -stacking interaction is stabilizing, this would lead to an increase in the spin-coupling leading to both larger  $g_x$  and  $g_y$  values. The observed behavior is not entirely consistent with this theoretical expectation: the  $g_x$ -value is shifted by  $4.5 \cdot 10^{-4}$  relatively to the in vitro model, while the  $g_y$ -value is shifted by no more than  $1 \cdot 10^{-4}$ . Further quantum mechanical calculations based on the new high-resolution crystallographic structure will likely shed light on the role of  $\pi$ -stacking.

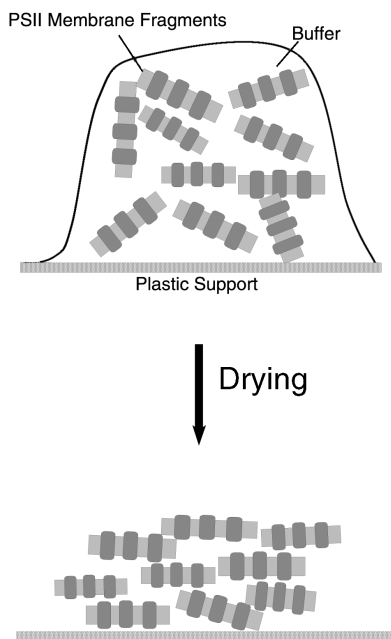
A particularly interesting HFEPR experiment on semiquinone is the study of the biradical  $Q_A^{\bullet-}Q_B^{\bullet-}$  in *R. sphaeroides*. With multifrequency data, it was possible to completely characterize the spin-spin coupling between the two radicals [94, 95]. The inter-radical distance of 1.72 nm obtained from the analysis of the 35 and 95 GHz data was in good agreement with crystal data (1.74 nm). A higher frequency (326 GHz) was required to obtain an accurate value for the isotropic interaction ( $-82$  MHz) [95]. This latter value was used to estimate the maximum electron-transfer rate. The comparison of this estimation with values from a database of various electron-transfer rates [96] show that the transfer is faster than expected by two orders of magnitude. One possible explanation for this difference may be that the protein medium between  $Q_A$  and  $Q_B$  is more conductive than assumed [97].

## 9 $Y_Z^{\bullet}$ -Manganese Spin Coupled Pair

In PSII preparations where calcium has been depleted or acetate-added, it is possible to trap a specific state in which the tyrosyl Z radical is magnetically coupled to the manganese cluster which is in a formal  $S = 1/2$  spin state [98, 99]. The study of this particular state became important as it was proposed that  $Y_Z$  is directly involved in water oxidation which takes place at the manganese cluster site [100]. The magnetic coupling of two spins  $1/2$  gives rise to a four-level system for which the lowest and highest states are the unperturbed  $|\beta\beta\rangle$  and  $|\alpha\alpha\rangle$  spin states, respectively, and the positions of the two inner levels depend on the interaction [101–103]. There are four allowed transitions, two from the lowest level (one towards each of the two inner levels) and one from each of the two inner levels towards the highest level. At 10 T, the energies of the allowed transitions from the lowest spin state are about 285 GHz. The corresponding temperature is 14 K. Therefore, for experiments carried out at 4 K, only the lowest state will be significantly populated and only two out of the four possible transitions will be observed. The sign of the interaction determines whether those transitions occur at higher or lower field compared to the transitions observed for the system in the absence of magnetic interaction. Therefore, it is possible to directly obtain the sign of the interaction by recording the 10 T/285 GHz of the coupled species at 4 K. The EPR spectra of the tyrosyl radical coupled to the manganese cluster in photosystem II have been recorded at 9, 95, 190 and 285 GHz both for calcium-depleted and acetate-treated material [104]. The interaction had already been shown to be a mixture of anisotropic dipolar coupling and isotropic exchange interaction, the latter being dominant particularly in acetate-treated samples [105–107]. In the case of calcium-depleted preparations, the signal observed at high field for the coupled species is located upfield compare to the unperturbed tyrosyl signal. On the other hand, in the case of acetate-treated preparations, the signal observed for the coupled system is located downfield compare to the unperturbed tyrosyl signal. This means that the coupling between the radical and the metal center has opposite sign between the two types of preparation. The coupling has been separated into two contributions, exchange and point dipolar. In acetate-treated samples the exchange interaction is ferromagnetic with a value of +0.82 GHz in PSII membranes and the dipolar coupling is –0.12 GHz. In calcium-depleted material, the exchange interaction is antiferromagnetic with a value of –0.42 GHz and the dipolar coupling is –0.1 GHz. The dipolar coupling leads to an effective spin-spin distance of about 0.9 nm between the two species.

## 10 Orientation Experiments

With the high  $g$ -resolution of HFEPR experiments, one-dimensionally (1-D) oriented samples of PSII have been studied and the angular orientation of  $Y_D^{\bullet}$ ,  $Q_A^{\bullet-}$ ,  $\text{Pheo}^{\bullet-}$  and  $\text{Chl}_Z^{++}$  have been measured [42, 80]. 1-D oriented samples of membrane bound proteins have long been exploited with 9 GHz EPR. Figure 6 shows conceptually



**Fig. 6.** Preparation of 1-D oriented samples. Membrane samples are painted on a thin plastic film and dried slowly. The membrane fragments gravitationally align yielding a 1-D oriented sample. The estimated mosaic spread determined from HFEPR experiments is  $20^\circ$  [42].

how the samples are prepared. The protein preparation is painted on a plastic support and allowed to slowly dry. The membrane fragments gravitationally align. Most of the conventional spectroscopy has been focusing on metal centers that have large  $g$ -anisotropies, such as cytochromes. 9 GHz experiments on radical do show orientation effects but are extremely difficult to analyze.

In 1-D ordered samples, it is unlikely that the local membrane normal will be exactly parallel to the support normal. This may result from imperfect orien-

**Table 2.** Summary of the angular orientations (Fig. 7) of radicals obtained from HFEPR measurements.

		$\alpha$ ( $^\circ$ )	$\beta$ ( $^\circ$ )	Reference
$Y_D^\bullet$	1-D oriented	64	18	42
	Single crystal	64	6	33
$Q_A^{\bullet-}$	PSII, 1-D oriented	72	69	42
	<i>R. viridis</i> , crystal structure	75	86	116
	<i>R. sphaeroides</i> , crystal structure	76	75	117
$A_1^{\bullet-}$		76	27	118
$\text{Pheo}^{\bullet-}$		70	2	42

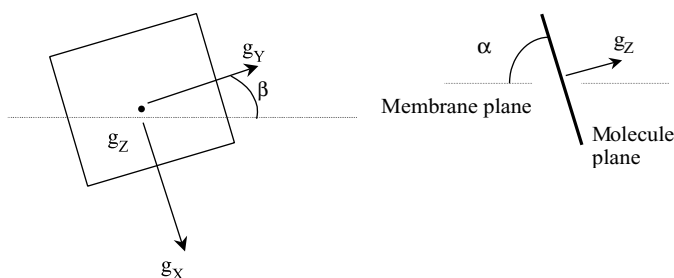


Fig. 7. Angular orientations of radicals.

tation of the membrane fragments or distribution in orientation of the protein with respect to the membrane (i.e., mosaic-spread). This problem was first analyzed by Blum and coworkers [108]. However, it was found that their treatment for the disorder is incorrect. A detailed discussion is found in ref. 42. The proper analysis of the HFEPR data led to an estimation of the mosaic-spread disorder of  $\pm 20^\circ$ . Even in the presence of this large disorder, the average orientation of the cofactors could be determined to within  $\pm 5^\circ$ . The orientations derived thus are summarized in Table 2. In the case of the pheophytin radical we have taken the  $g$ -tensor orientation as determined from ADF-ZORA calculations.

The magnetic-field itself can be used to align samples. Berthold and coworkers [109] have shown that suspensions of whole cells frozen in a 3 T magnetic field exhibit  $P_{700}^{+}A_1^{-}$  radical-pair signals that show partial ordering effects.

There have been a number of applications of transient 95 GHz HFEPR experiments to study  $P_{700}^{+}A_1^{-}$  radical pairs in PSI [64, 109, 110]. The inherently higher  $g$ -resolution at higher field makes these experiments very sensitive to relative orientation of the spin-coupling tensors and the  $g$ -tensors. Hence, one is able to measure the relative orientation of the molecules that make up the radical pair as well as the distance between the radicals. The results obtained with this method have been confirmed by the higher resolution of the PSI crystal structure [3].

## 11 Overview and Perspectives

HFEPR measurements of  $g$ -values of radicals in PSI and PSII have provided valuable structural information. At one level HFEPR has contributed to determine large-scale structural features such as identifying components as well as the relative orientation of several cofactors. For PSII, such information remains well ahead of that currently available from low-resolution crystal structure. In the case of PSI, HFEPR contributed to understanding the structural arrangement of the cofactors. At the time of writing this review, the current model for PSI, much of which has been obtained through spectroscopic measurements, is superseded by the publication of the crystal structure with a resolution of 0.25 nm. However, when it comes to structural questions on a smaller scale, HFEPR measure-



ments have provided details about the electronic structure of the radicals and their interactions with the protein environment. Such information about the paramagnetic state is extremely difficult to ascertain from the crystal structures. HFEPR will certainly continue to play an important role in this area.

In principle, HFEPR should be an appropriate method for understanding structural aspects of the Mn cluster that constitutes the active site for water oxidation in PSII. So far however HFEPR of the Mn cluster have yet to be reported although studies of relevant model systems have been done [111]. Given the interest in this important enzyme, future improvements in instrumentation will doubtless be made motivated by the desire to study the signals from the PSII Mn cluster.

It can be seen that HFEPR studies on PSI and PSII have provided a valuable test-bed for biological applications of the method itself. Since the first applications to photosynthetic reaction centers, HFEPR has been extended to the study of an increasing number of radical-containing proteins, an area that has been in rapid expansion in recent years. HFEPR has the potential to play an expanding role in understanding structure and mechanism in these radical-proteins.

### Acknowledgements

We thank all the past and present members of our research group involved in HFEPR experiments, especially Moritz Knüpling who was involved in the development of the HFEPR spectrometer and Anabella Ivancich for her stimulating input and major contributions to HFEPR studies of numerous other proteins. This work was supported by Grant RGO349 from the Human Frontiers Science Organization and by grants from the European Union through Human Capital and Mobility Grants FMRX-CT98-0214 and FMRX-CT96-0031 and from the Région Ile-de-France (contrat Sésame). P.D. acknowledges the CEA for a fellowship.

### References

1. Möbius K.: *Chem. Soc. Rev.* **29**, 129–139 (2000)
2. Zouni A., Witt H.-T., Kern J., Fromme P., Krauss N., Saenger W., Orth P.: *Nature* **409**, 739–743 (2001)
3. Jordan P., Fromme P., Witt H.T., Klukas O., Saenger W., Krauss N.: *Nature* **411**, 909–917 (2001)
4. Stone A.J.: *Proc. R. Soc. Lond. A* **271**, 424–434 (1963)
5. Stone A.J.: *Mol. Phys.* **6**, 509–515 (1963)
6. Stone A.J.: *Mol. Phys.* **7**, 311–316 (1964)
7. Stubbe J.A., van der Donk W.A.: *Chem. Rev.* **98**, 2661–2661 (1998)
8. Un S., Atta M., Fontecave M., Rutherford A.W.: *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 10713–10719 (1995)
9. Törring J.T., Un S., Knüpling M., Plato M., Möbius K.: *J. Chem. Phys.* **107**, 3905–3913 (1997)
10. Engström M., Himo F., Gräslund A., Minaev B., Vahtras O., Agren H.: *J. Phys. Chem. A* **104**, 5149–5153 (2000)
11. Burghaus O., Plato M., Rohrer M., Möbius K., MacMillan F., Lubitz W.: *J. Phys. Chem.* **97**, 7639–7647 (1993)
12. Hales B.J.: *J. Am. Chem. Soc.* **97**, 5993–5997 (1975)
13. Hales B.J.: *J. Am. Chem. Soc.* **98**, 7350–7357 (1976)

14. Hales B.J.: *J. Chem. Phys.* **65**, 3762–3772 (1976)
15. Hales B.J., Case E.E.: *Biochim. Biophys. Acta* **637**, 291–302 (1981)
16. Malkina O.L., Vaara J., Schimmelpfennig B., Munzarova M., Malkin V.G., Kaupp M.: *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 9206–9218 (2000)
17. Chuvylkin N.D., Zhidomirov G.M.: *Mol. Phys.* **25**, 1233–1235 (1973)
18. van Lenthe E., Snijders J.G., Baerends E.J.: *J. Chem. Phys.* **105**, 6505–6516 (1996)
19. Amsterdam Density Functional Program Package, ADF1999.02 (1999)
20. Baerends E.J., Ellis D.E., Ros P.: *Chem. Phys.* **2**, 41–51 (1973)
21. Versluis L., Ziegler T.: *J. Chem. Phys.* **88**, 322–328 (1988)
22. te Velde G., Baerends E.J.: *J. Comput. Phys.* **99**, 84–98 (1992)
23. Fonseca Guerra C., Snijders J.G., te Velde G., Baerends E.J.: *Theor. Chem. Acc.* **99**, 391–403 (1998)
24. Prisner T.F. in: *Advances in Magnetic and Optical Resonance* (Warren W.S., ed.). San Diego: Academic Press 1996.
25. Becerra L.R., Gerfen G.J., Bellew B.F., Bryant J.A., Hall D.A., Inati S.J., Weber R.T., Un S., Prisner T.F., McDermott A.E., Fishbein K.W., Kreisler K.E., Temkin R.J., Singel D.J., Griffin R.G.: *J. Magn. Reson. Ser. A* **117**, 28–40 (1995)
26. Budil D.E., Earle K.A., Lynch B., Freed J. in: *Advanced EPR in Biology and Biochemistry* (Hoff A.J., ed.). Amsterdam: Elsevier 1989.
27. Grinberg O.Y., Dubinskii A.A., Lebedev Y.S.: *Russ. Chem. Rev.* **52**, 850–865 (1983)
28. Smith G.M., Riedi P.C. in: *Electron Paramagnetic Resonance* (Gilbert B.C., Davies M.J., McLauchlan K.A., eds.), pp. 164–204. Cambridge: Royal Society of Chemistry 2000.
29. Muller F., Hopkins M.A., Coron N., Grynberg M., Brunel L.C., Martinez G.: *Rev. Sci. Instrum.* **60**, 3681–3684 (1989)
30. Un S., Bryant J.A., Griffin R.G.: *J. Magn. Reson. A* **101**, 92–94 (1993)
31. Stesmans A., Vangorp G.: *Rev. Sci. Instrum.* **60**, 2949–2952 (1989)
32. De Wijn H.W., Van Balder En R.F.: *J. Chem. Phys.* **46**, 1381–1387 (1967)
33. Hofbauer W., Zouni A., Bittl R., Kern J., Orth P., Lendzian F., Fromme P., Witt H.T., Lubitz W.: *PNAS* **98**, 6623–6628 (2001)
34. Barry B.A., Babcock G.T.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 7099–7103 (1987)
35. Debus R.J., Barry B.A., Babcock G.T., McIntosh L.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 427–430 (1988)
36. Vermaas W.F.J., Rutherford A.W., Hansson Ö.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 8477–8481 (1988)
37. Sjöberg B.M., Reichard P., Graslund A., Ehrenberg A.: *J. Biol. Chem.* **252**, 536–541 (1977)
38. Sjöberg B.M., Reichard P., Graslund A., Ehrenberg A.: *J. Biol. Chem.* **253**, 6863–6865 (1978)
39. Gulin V.I., Dikanov S.A., Tsvetkov Y.D., Evelo R.G., Hoff A.J.: *Pure Appl. Chem.* **64**, 903–906 (1992)
40. Un S., Brunel L.C., Brill T.M., Zimmermann J.L., Rutherford A.W.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 5262–5266 (1994)
41. Farrar C.T., Gerfen G.J., Griffin R.G., Force D.A., Britt R.D.: *J. Phys. Chem. B* **101**, 6634–641 (1997)
42. Dorlet P., Rutherford A.W., Un S.: *Biochemistry* **39**, 7826–7834 (2000)
43. Un S., Tang X.S., Diner B.A.: *Biochemistry* **35**, 679–684 (1996)
44. Tang X.S., Chisholm D.A., Dismukes G.C., Brudvig G.W., Diner B.A.: *Biochemistry* **32**, 13742–13748 (1993)
45. Mezzetti A., Maniero A.L., Brustolon M., Giacometti G., Brunel L.C.: *J. Phys. Chem. A* **103**, 9636–9643 (1999)
46. Ivancich A., Dorlet P., Goodin D.B., Un S.: *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 5050–5058 (2001)
47. Babcock G.T., Blankenship R.E., Sauer K.: *FEBS Lett.* **61**, 286–289 (1976)
48. Tommos C., Tang X.S., Warncke K., Hoganson C.W., Styring S., McCracken J., Diner B.A., Babcock G.T.: *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 10325–10335 (1995)
49. Tang X.S., Zheng M., Chisholm D.A., Dismukes G.C., Diner B.A.: *Biochemistry* **35**, 1475–1484 (1996)
50. Force D.A., Randall D.W., Britt R.D., Tang X.S., Diner B.A.: *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 12643–12644 (1995)
51. Dorlet P.: Ph.D. Thesis, Université Paris XI, Orsay, France 2000.
52. Ivancich A., Mattioli T.A., Un S.: *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 5743–5753 (1999)

53. Ivancich A., Jouve H.M., Gaillard J.: *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 12852–12853 (1996)
54. Ivancich A., Jouve H.M., Sartor B., Gaillard J.: *Biochemistry* **36**, 9356–9364 (1997)
55. Babcock G.T., Barry B.A., Debus R.J., Hoganson C.W., Atamian M., McIntosh L., Sithole I., Yocum C.F.: *Biochemistry* **28**, 9557–9565 (1989)
56. Dixon W.T., Murphy D.: *J. Chem. Soc. Faraday Trans. II* **72**, 1221–1230 (1976)
57. Maki T., Araki Y., Ishida Y., Onomura O., Matsumura Y.: *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 3371–3372 (2001)
58. Dole F., Diner B.A., Hoganson C.W., Babcock G.T., Britt R.D.: *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 11540–11541 (1997)
59. Hoganson C.W., Sahlin M., Sjöberg B.M., Babcock G.T.: *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 4672–4679 (1996)
60. Un S., Gerez C., Elleingand E., Fontecave M.: *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 3048–3054 (2001)
61. MacMillan F., Rohrer M., Krzystek J., Brunel L.C., Rutherford A.W. in: *Photosynthesis: Mechanisms and Effects* (Garab G., ed.), pp. 715–718. Dordrecht: Kluwer 1998.
62. Bratt P.J., Poluektov O.G., Thurnauer M.C., Krzystek J., Brunel L.C., Schrier J., Hsiao Y.W., Zerner M., Angerhofer A.: *J. Phys. Chem. B* **104**, 6973–6977 (2000)
63. Lakshmi K.V., Reifler M.J., Brudvig G.W., Poluektov O.G., Wagner A.M., Thurnauer M.C.: *J. Phys. Chem. B* **104**, 10445–10448 (2000)
64. Zech S.G., Hofbauer W., Kamlowski A., Fromme P., Stehlik D., Lubitz W., Bittl R.: *J. Phys. Chem. B* **104**, 9728–9739 (2000)
65. Bratt P.J., Rohrer M., Krzystek J., Evans M.C.W., Brunel L.C., Angerhofer A.: *J. Phys. Chem. B* **101**, 9686–9689 (1997)
66. Plato M., Mobius K.: *Chem. Phys.* **197**, 289–295 (1995)
67. Hsiao Y.W., Zerner M.C.: *Int. J. Quantum Chem.* **75**, 577–584 (1999)
68. Bratt P.J., Ringus E., Hassan A., Van Tol H., Maniero A.L., Brunel L.C., Rohrer M., Bubenzer-Hange C., Scheer H., Angerhofer A.: *J. Phys. Chem. B* **103**, 10973–10977 (1999)
69. Kass H., Bittersmannweidlich E., Andreasson L.E., Bonigk B., Lubitz W.: *Chem. Phys.* **194**, 419–432 (1995)
70. Kass H., Fromme P., Lubitz W.: *Chem. Phys. Lett.* **257**, 197–206 (1996)
71. Kass H., Lubitz W.: *Chem. Phys. Lett.* **251**, 193–203 (1996)
72. Mac M., Bowlby N.R., Babcock G.T., McCracken J.: *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 13215–13223 (1998)
73. Gall A., Ellervee A., Bellissent-Funel M.C., Robert B., Freiberg A.: *Biophys. J.* **80**, 1487–1497 (2001)
74. Van Mieghem F.J.E., Nitschke W., Mathis P., Rutherford A.W.: *Biochim. Biophys. Acta* **977**, 207–214 (1989)
75. Dorlet P., Ling X., Sayre R.T., Un S.: *J. Biol. Chem.* **276**, 22313–22316 (2001)
76. Visser J.W.M., Rjgersberg C.P., Gast P.: *Biochim. Biophys. Acta* **460**, 36–46 (1977)
77. Hanley J., Deligiannakis Y., Pascal A., Faller P., Rutherford A.W.: *Biochemistry* **38**, 8189–8195 (1999)
78. Deligiannakis Y., Hanley J., Rutherford A.W.: *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 400–401 (2000)
79. Faller P., Maly T., Rutherford A.W., MacMillan F.: *Biochemistry* **40**, 320–326 (2001)
80. Faller P., Rutherford A.W., Un S.: *J. Phys. Chem. B* **104**, 10960–10963 (2000)
81. Konovalova T.A., Krzystek J., Bratt P.J., van Tol J., Brunel L.C., Kispert L.D.: *J. Phys. Chem. B* **103**, 5782–5786 (1999)
82. Butler W.F., Calvo R., Fredkin D.R., Isaacson R.A., Okamura M.Y., Feher G.: *Biophys. J.* **45**, 947–973 (1984)
83. Deligiannakis Y., Jegerschold C., Rutherford A.W.: *Chem. Phys. Lett.* **270**, 564–572 (1997)
84. Sanakis Y., Petrouleas V., Diner B.A.: *Biochemistry* **33**, 9922–9928 (1994)
85. Astashkin A.V., Kawamori A., Kodera Y., Kuroiwa S., Akabori K.: *J. Chem. Phys.* **102**, 5583–5588 (1995)
86. MacMillan F., Lenzian F., Renger G., Lubitz W.: *Biochemistry* **34**, 8144–8156 (1995)
87. Knüpling M., Törring J.T., Un S.: *Chem. Phys.* **219**, 291–304 (1997)
88. Deligiannakis Y., Hanley J., Rutherford A.W.: *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 7653 (1999)
89. Knüpling M.: Ph.D. Thesis, Freie Universität Berlin, Berlin, Germany 1999.
90. Rigby S.E.J., Evans M.C.W., Heathcote P.: *Biochemistry* **35**, 6651–6656 (1996)
91. Muhiuddin I.P., Rigby S.E.J., Evans M.C.W., Ames J., Heathcote P.: *Biochemistry* **38**, 7159–7167 (1999)

92. Hanley J., Deligiannakis Y., MacMillan F., Bottin H., Rutherford A.W.: *Biochemistry* **36**, 11543–11549 (1997)
93. Kamlowski A., Altenberg-Greulich B., van der Est A., Zech S.G., Bittl R., Fromme P., Lubitz W., Stehlik D.: *J. Phys. Chem. B* **102**, 8278–8287 (1998)
94. Calvo R., Hofbauer W., Lendzian F., Lubitz W., Paddock M.L., Abresch E.C., Isaacson R.A., Okamura M.Y., Feher G.: *Biophys. J.* **76**, A392–A392 (1999)
95. Calvo R., Isaacson R.A., Paddock M.L., Abresch E.C., Okamura M.Y., Maniero A.L., Brunel L.C., Feher G.: *J. Phys. Chem. B* **105**, 4053–4057 (2001)
96. Page C.C., Moser C.C., Chen X., Dutton P.L.: *Nature* **402**, 47–52 (1999)
97. Calvo R., Abresch E.C., Bittl R., Feher G., Hofbauer W., Isaacson R.A., Lubitz W., Okamura M.Y., Paddock M.L.: *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 7327–7341 (2000)
98. Boussac A., Zimmermann J.L., Rutherford A.W., Lavergne J.: *Nature* **347**, 303–306 (1990)
99. MacLachlan D.J., Nugent J.H.: *Biochemistry* **32**, 9772–9780 (1993)
100. Babcock G.T., Espe M., Hoganson C., Lydakis-Simantiris N., McCracken J., Shi W., Styring S., Tommos C., Warnecke K.: *Acta Chem. Scand.* **51**, 533–540 (1997)
101. Smith T.D., Pilbrow J.R.: *Coord. Chem. Rev.* **13**, 173–278 (1974)
102. Eaton S.S., More K.M., Sawant B.M., Boymel P.M., Eaton G.R.: *J. Magn. Reson.* **52**, 435–449 (1983)
103. Hore P.J. in: *Advanced EPR: Applications in Biology and Biochemistry* (Hoff A.J., ed.). Amsterdam: Elsevier 1989.
104. Dorlet P., Boussac A., Rutherford A.W., Un S.: *J. Phys. Chem. B* **103**, 10945–10954 (1999)
105. Dorlet P., Di Valentin M., Babcock G.T., McCracken J.L.: *J. Phys. Chem. B* **102**, 8239–8247 (1998)
106. Lakshmi K.V., Eaton S.S., Eaton G.R., Frank H.A., Brudvig G.W.: *J. Phys. Chem. B* **102**, 8327–8335 (1998)
107. Peloquin J.M., Campbell K.A., Britt R.D.: *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 6840–6841 (1998)
108. Blum H., Salerno J.C., Leigh J.S.J.: *J. Magn. Reson.* **30**, 385–391 (1978)
109. Berthold T., Bechtold M., Heinen U., Link G., Poluektov O.G., Utschig L.M., Tang J., Thurnauer M.C., Kothe G.: *J. Phys. Chem. B* **103**, 10733–10736 (1999)
110. van der Est A., Prisner T.F., Bittl R., Fromme P., Lubitz W., Mobius K., Stehlik D.: *J. Phys. Chem. B* **101**, 1437–1443 (1997)
111. Polcar C., Knupling M., Frapart Y.M., Un S.: *J. Phys. Chem. B* **102**, 10391–10398 (1998)
112. Gerfen G.J., Bellew B.F., Un S., Bollinger J.M. Jr., Stubbe J., Griffin R.G., Singel D.J.: *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 6420–6421 (1993)
113. Huber M., Topping J.T.: *Chem. Phys.* **194**, 379–385 (1995)
114. Prisner T.F., McDermott A.E., Un S., Norris J.R., Thurnauer M.C., Griffin R.G.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 9485–9488 (1993)
115. Bowman M.K., Thurnauer M.C., Norris J.R., Dikanov S.A., Gulín V.I., Tyryshkin A.M., Samoilova R.I., Tsvetkov Y.D.: *Appl. Magn. Reson.* **3**, 353–368 (1992)
116. Deisenhofer J., Epp O., Sinning I., Michel H.: PDB code 1PRC (revised 1PRCC) (1994)
117. Yeates T.O., Komiya H., Chirino A., Rees D.C., Allen J.P., Feher G.: PDB code 4RCR (1993)
118. MacMillan F., Hanley J., van der Weerd L., Knupling M., Un S., Rutherford A.W.: *Biochemistry* **36**, 9297–9303 (1997)
119. Klukas O., Schubert W.D., Jordan P., Krauss N., Fromme P., Witt H.T., Saenger W.: *J. Biol. Chem.* **274**, 7351–7360 (1999)
120. Klukas O., Schubert W.D., Jordan P., Krauss N., Fromme P., Witt H.T., Saenger W.: *J. Biol. Chem.* **274**, 7361–7367 (1999)

**Authors' address:** Sun Un, Section de Bioénergétique, CNRS URA 2096, Bât. 532, CEA Saclay 91191 Gif-sur-Yvette cedex, France

# High-Field EPR Study of Tyrosyl Radicals in Prostaglandin H<sub>2</sub> Synthase-1<sup>†</sup>

Pierre Dorlet,<sup>\*,‡,§</sup> Steve A. Seibold,<sup>||</sup> † Gerald T. Babcock,<sup>||</sup> Gary J. Gerfen,<sup>#</sup> William L. Smith,<sup>⊥</sup> Ah-lim Tsai,<sup>▽</sup> and Sun Un<sup>§</sup>

*Section de Bioénergétique, CNRS URA 2096, CEA Saclay, Bât. 532, 91191 Gif-sur-Yvette Cedex, France, Departments of Chemistry and Biochemistry, Michigan State University, East Lansing, Michigan 48824, Department of Internal Medicine, University of Texas Health Science Center at Houston, Houston, Texas 77225, and Albert Einstein College of Medicine, 1300 Morris Park Avenue, Bronx, New York 10461*

*Received October 19, 2001; Revised Manuscript Received March 11, 2002*

**ABSTRACT:** Various tyrosyl radicals generated by reaction of both native and indomethacin-inhibited ovine prostaglandin H synthase-1 with ethyl hydrogen peroxide were examined by using high-field/high-frequency EPR spectroscopy. The spectra for the initially formed tyrosyl radical commonly referred to as the “wide-doublet” species and the subsequent “wide-singlet” species as well as the indomethacin-inhibited “narrow-singlet” species were recorded at several frequencies and analyzed. For all three species, the *g*-values were distributed. In the case of the wide doublet, the high-field EPR spectra indicated that dominant hyperfine coupling was likely to be also distributed. The *g<sub>x</sub>*-values for all three radicals were found to be consistent with a hydrogen-bonded tyrosyl radical. In the case of the wide-doublet species, this finding is consistent with the known position of the radical and the crystallographic structure and is in contradiction with recent ENDOR measurements. The high-field EPR observations are consistent with the model in which the tyrosyl phenyl ring rotates with respect to both the protein backbone and the putative hydrogen bond donor during evolution from the wide-doublet to the wide-singlet species. The high-field spectra also indicated that the *g*-values of two types of narrow-singlet species, self-inactivated and indomethacin-inhibited, were likely to be different, raising the possibility that the site of the radical is different or that the binding of the inhibitor perturbs the electrostatic environment of the radical. The 130 GHz pulsed EPR experiments performed on the wide-doublet species indicated that the possible interaction between the radical and the oxoferryl heme species was very weak.

Prostaglandin H synthase (PGHS)<sup>1</sup> is a membrane-bound enzyme that exists as two isoforms, PGHS-1 and PGHS-2 (*J*). It is a key enzyme in the biosynthesis of prostaglandins and thromboxanes from arachidonic acid. It catalyzes the conversion of arachidonic acid into prostaglandin G<sub>2</sub> (cyclooxygenase) as well as the two-electron reduction of prostaglandin G<sub>2</sub> in prostaglandin PGH<sub>2</sub> (peroxidase). Thus the enzyme possesses both peroxidase and cyclooxygenase activity. The active site is distinct for each activity (2–5),

but the cyclooxygenase reaction depends on the prior oxidation of the heme at the peroxidase active site. In the peroxidase cycle, the native state reacts with a peroxide species to form Compound I via a peroxy state. The so-called Intermediate II is composed of an oxoferryl entity on the heme together with a radical which has been shown to be located on tyrosine residue 385, and this radical initiates the cyclooxygenase cycle of the enzyme.

The crystallographic structure of oPGHS-1 has been determined (3) as well as the structures of the enzyme with bound arachidonic acid (6) or with bound inhibitors (7–9). In the peroxidase active site, located on the opposite side from the membrane-binding domain, the center of the heme is located about 12 Å from the phenoxyl oxygen of the Tyr385 residue which is at the edge of the cyclooxygenase active site constituted by a long hydrophobic channel where the substrate, as well as inhibitors such as indomethacin or aspirin, binds.

Several EPR signals of radicals have been reported in the studies of o-PGHS1 reactions. Mixing of oPGHS-1 with ethyl hydroperoxide in the presence of oxygen results in an initial formation of a radical species which exhibits a doublet line shape EPR signal, known as the wide doublet (WD), with a peak-to-trough width of about 33 G at 9 GHz (10, 11). Upon incubation at 273 K, this signal rapidly evolves into a singlet line shape EPR signal with a similar width, the wide singlet (WS), before narrowing down to a 26 G wide singlet, the

<sup>†</sup> This work was supported by grants from the Human Frontiers Science Organization (Contract RGO349), from the EU through HCM grants FMRX-CT98-0214 and FMRX-CT96-0031, from the Région Île-de-France (Contract Sésame) (P.D., S.U.), from PGG P01 GM57323 (W.L.S., S.A.S.), from NIH GM44911 (A.T.), from NIH GM60609 and NSF DBI-0096713 (G.J.G.). P.D. was supported by a fellowship from the CEA.

\* To whom correspondence should be addressed: e-mail, pierre.dorlet@free.fr; telephone, +39 498275139; fax, +39 498275135.

<sup>‡</sup> Present address: Dipartimento di Chimica Fisica, Università degli Studi di Padova, Via Loredan 2, 35131 Padova, Italy.

<sup>§</sup> Section de Bioénergétique, CEA Saclay.

<sup>||</sup> Department of Chemistry, Michigan State University.

<sup>⊥</sup> Department of Biochemistry, Michigan State University.

<sup>#</sup> Albert Einstein College of Medicine.

<sup>▽</sup> University of Texas Health Science Center at Houston.

<sup>1</sup> Abbreviations: CcP, cytochrome *c* peroxidase; CW, continuous wave; ENDOR, electron nuclear double resonance; EPR, electron paramagnetic resonance; EtOOH, ethyl hydroperoxide; HFEPR, high-field EPR; NS, narrow singlet; oPGHS-1, ovine PGHS-1; PGHS-1, prostaglandin endoperoxide H synthase-1; WD, wide doublet; WS, wide singlet.

self-inactivated narrow singlet (NS), upon longer incubation times (12). A narrow-singlet EPR signal, known as the inhibited narrow singlet, is also observed directly when the enzyme is pretreated with inhibitors of the cyclooxygenase activity (13). On the basis of deuterium labeling studies (14), it has been shown that all three species are tyrosine residues. The differences in the 9 GHz EPR experiments predominantly arise from differences in the electron–nuclear hyperfine coupling between the unpaired electron and the  $\beta$  protons.

An important issue is to determine whether all of these radicals correspond to the same site or to different ones. The wide-doublet species has been attributed to the Tyr385 residue after the results of chemical modification (nitration) (15) and mutagenesis studies (14). This residue has a prominent role in the rate-determining step in cyclooxygenase catalysis (see ref 16 and references cited therein). On the basis of results of computer simulations, DeGray and co-workers concluded that the WS was in fact a sum of the WD signal and the self-inactivated NS (12), but the relationship between the two narrow singlets, self-inactivated and inhibited, was not addressed. Tsai and co-workers (17, 18) have suggested that the two types of NS correspond to distinct radicals. Experimental data supporting this fact were recently reported by Shi and co-workers using EPR and ENDOR spectroscopies (19). In this study, it was also concluded that the WS was in fact the sum of varying contributions of WD and self-inactivated NS spectra. On the basis of the absence of any detectable solvent-exchangeable protons, the ENDOR study of the WD species led to the conclusion that the radical responsible for this signal was not hydrogen-bonded (19).

Because tyrosyl radical  $g$ -values are sensitive probe of the environment of the radicals (20–22), we have used high-field EPR spectroscopy to further characterize the WD, WS, and indomethacin-inhibited NS. The spectra for these species were recorded at 190 and 285 GHz. Using such a multifrequency approach, it is possible to separate effects due to the  $g$ -values of the radical from those due to hyperfine interaction. The line shape of all three species spectra indicated that both  $g$ -tensor and hyperfine interaction parameters were distributed, in particular for the WD radical. The hydrogen-bonding status for the WD radical was analyzed in the light of the value measured for the  $g_x$  component and compared to the previous ENDOR and crystallographic studies. We also present pulsed EPR measurements performed at 130 GHz to study the possible magnetic interaction between the tyrosyl radical and the oxoferryl heme species.

## MATERIALS AND METHODS

**Sample Preparation.** Ethyl hydroperoxide was purchased from Polyscience Inc. (Warrington, PA). Indomethacin and hemin were obtained from Sigma. oPGHS-1 was purified as described in ref 23. For the CW EPR measurements, the WD tyrosyl radical sample was prepared by mixing the oPGHS-1 sample (30  $\mu$ M in 50 mM HEPES buffer, pH 7, with 0.15% decyl maltoside) with a 2-fold excess of EtOOH directly in a 4 mm EPR tube, at 0 °C, and freeze-trapping in acetone/dry ice after 2 s. The WS tyrosyl radical sample was obtained by a thawing–freezing cycle of the WD sample. For the inhibited narrow singlet tyrosyl radical

sample, oPGHS-1 was first exposed to indomethacin (40  $\mu$ M in 50 mM HEPES buffer, pH 7, with 0.15% decyl maltoside), at 0 °C, for approximately 1 h and then reacted for 2 s with a 2-fold excess of ethyl hydroperoxide at 0 °C in an EPR tube before freezing in acetone/dry ice. Samples were stored in liquid nitrogen.

The samples used in the pulsed experiments were distinct from those used in the CW experiments for technical reasons and were prepared as previously described (10). After PGHS was mixed with EtOOH to initiate radical formation, the samples were drawn into 0.40 mm  $\times$  0.55 mm Suprasil quartz capillary tubes and frozen in liquid nitrogen. The total preparation time in this case was 6 s, after which time the 9 GHz spectrum still exhibited a predominant WD line shape. The samples were stored and loaded into the HFEPR probe under liquid nitrogen. The total active sample volume was approximately 125 nL.

**EPR Spectroscopy.** The 9 GHz EPR spectra were recorded with a TE<sub>102</sub> cavity on a Bruker ESP300e spectrometer equipped with a liquid helium continuous-flow cryostat and transfer line from Oxford Instruments. The microwave frequency was measured with a Hewlett-Packard 5350B frequency counter connected to the microwave bridge. The 190 and 285 GHz EPR spectra were recorded on the transmission spectrometer built in Saclay, which is described elsewhere (24). The HFEPR spectra were recorded on the same samples used for the 9 GHz measurements.

The 130 GHz pulsed experiments were performed on a spectrometer assembled at Albert Einstein College of Medicine, which uses a bridge designed and built at the Donetsk Physico-Technical Institute of the Ukrainian National Academy of Sciences. It is a reflection spectrometer which employs a double-frequency conversion heterodyne detection scheme and cylindrical resonators operating in the TE<sub>011</sub> mode. Typical  $\pi/2$  pulse widths are 30–50 ns. The magnetic field is generated using a 7 T Magnex superconducting magnet equipped with a  $\pm 0.5$  T sweep/active shielding coil. Temperature regulation of approximately  $\pm 0.3$  K is achieved using an Oxford Spectrostat continuous-flow cryostat and ITC503 temperature controller.

**Simulations of EPR Data.** Second-order perturbation equations were used to calculate the spectrum. The high-field tyrosyl powder spectra were generated by calculating the resonant field for  $10^6$  random orientations of the applied magnetic field with respect to the  $g$ -axis frame and summing the results. The transition probability was taken to be unity. The resulting orientation-integrated spectra were convoluted with a derivative Gaussian function of suitable line width. Distributions in  $g$ -values were simulated by introducing a tensor, the principal values of which were collinear with the  $g$ -tensor of the radical. The principal values of the broadening tensor were the widths of Gaussian distributions along the three directions. Gaussian distributions were obtained by the method of normal deviates (25). The 190 and 285 GHz spectra were fitted simultaneously. All calculations were performed on a Digital Equipment Corp. workstation by using local programs written in Fortran 77.

## RESULTS

Figures 1–3 show the HFEPR spectra of the so-called wide doublet (WD), wide singlet (WS), and indomethacin-



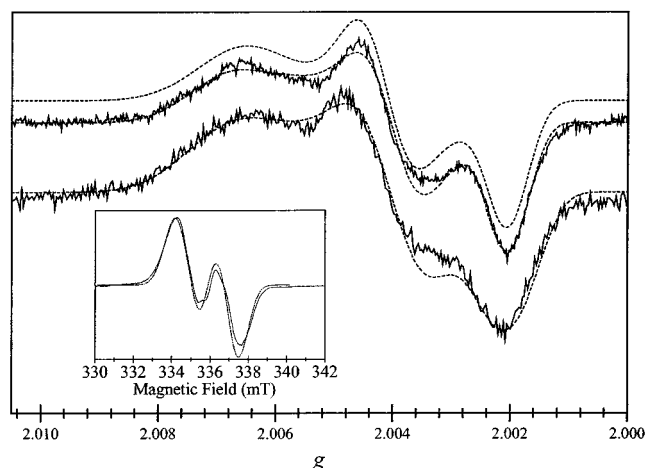


FIGURE 1: EPR spectra of the WD species generated by 2 s time reaction of PGHS-1 with EtOOH at 0 °C. Top spectra: 285 GHz. Bottom spectra: 190 GHz. Modulation amplitude: 20 G for both spectra. Solid line: experimental data. Dashed line: simulations. The top simulated spectrum has been calculated using the  $S = 1$ ,  $S = 1/2$  interaction model (see text for details). Inset: 9 GHz spectrum recorded on the same sample used to record the HFEPR spectra at 190 and 285 GHz. Modulation amplitude: 3 G. Time constant: 41 ms. The parameters for the powder pattern simulations are listed in Table 1; the parameters for the  $S = 1$ ,  $S = 1/2$  simulation are listed in Table 2.

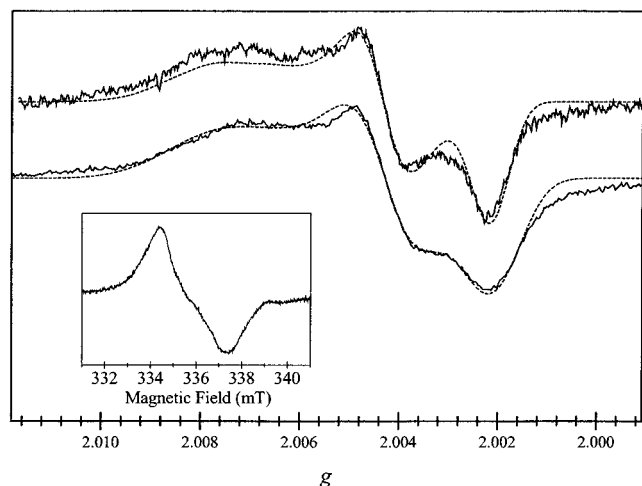


FIGURE 2: EPR spectra of the WS species obtained by incubation of the WD sample at 4 °C for 15 s. Top spectra: 285 GHz. Bottom spectra: 190 GHz. Modulation amplitude: 20 G for both spectra. Inset: 9 GHz spectrum. Modulation amplitude: 3 G. Time constant: 164 ms. All spectra have been recorded on the same sample. Solid line: experimental data. Dashed line: simulations. The parameters for the simulations are listed in Table 1.

inhibited narrow singlet (NS), respectively. In each case, the corresponding 9 GHz spectrum of the same sample is shown in the inset. The WD sample was generated by reacting oPGHS-1 with a 2-fold excess of EtOOH for 2 s at 0 °C. The 9 GHz WD spectrum (Figure 1, inset) exhibited the usual wide-doublet line shape with a peak-to-trough splitting of 33 G (13, 26). This doublet structure is due to the hyperfine coupling of one of the  $\beta$ -methylene protons (see Scheme 1). The WS sample was obtained by incubation of the WD sample at 4 °C for 15 s. The 9 GHz WS spectrum (Figure 2, inset) is characterized by a singlet-like spectrum with a peak-to-rough width of 30 G. Reaction of indomethacin-treated oPGHS-1 samples with ethyl hydroperoxide directly yielded

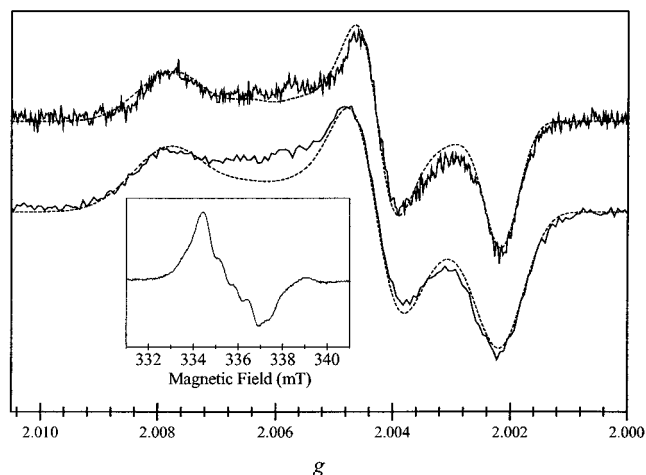


FIGURE 3: EPR spectra of the indomethacin-inhibited NS species obtained by reaction of indomethacin-treated PGHS-1 with EtOOH for 2 s. Top spectra: 285 GHz. Bottom spectra: 190 GHz. Modulation amplitude: 20 G for both spectra. Inset: 9 GHz spectrum. Modulation amplitude: 3 G. Time constant: 82 ms. All spectra have been recorded on the same sample. Solid line: experimental data. Dashed line: simulations. The parameters for the simulations are listed in Table 1.

samples with a 9 GHz singlet-like line shape with a narrower peak-to-trough width of 25 G.

At 285 GHz and 10 T, the HFEPR spectra (Figures 1–3, upper traces) of the three types of samples were clearly different from the corresponding 9 GHz spectra. The overall spectra width ranged from about 230 to 290 G; the NS spectrum was broader than the WD. As expected from theory, the high-field edge of the spectra corresponding to the  $g_z$ -value was slightly lower than the free electron  $g$ -value of 2.00232 (27). The low-field edge corresponding to the  $g_x$ -value differed with the following order:  $g_x(\text{NS}) > g_x(\text{WS}) > g_x(\text{WD})$ . The indomethacin-inhibited NS  $g_x$ -value (2.0078) was similar to that of the tyrosine D radical in photosystem II (2.00756), and the WD value (2.0068) was similar to that of the tyrosyl radical in tyrosine HCl crystals (2.00658). In all three cases, the hyperfine structure could not be resolved, and the spectra were broadened to an extent that could not be accounted for solely by unresolved hyperfine couplings. To clarify the relative contributions to inhomogeneous line widths, we obtained spectra at 190 GHz.

Hyperfine interactions, which dominate the 9 GHz PGHS spectra, are to first order independent of the applied magnetic field. By comparison, the Zeeman interaction is directly proportional to the applied magnetic field. Therefore, by recording the HFEPR spectra at two different frequencies, it is possible to separate the contributions from hyperfine and Zeeman interactions. This is visually accomplished by plotting the multifrequency data as a function of  $g$ -values rather than magnetic field. When plotted in this manner, the line widths of the features that are dominated by hyperfine couplings will have an inverse relationship to the microwave frequency and those dominated by Zeeman interaction will be frequency independent. Figures 1–3 show the 190 and 285 GHz spectra of the WD, WS, and inhibited NS samples plotted as a function of  $g$ -values.

The overall frequency dependence of the HFEPR spectra of the three types of samples was approximately the same. In each case, the  $g_z$ -edge (high-field edge) of the 190 GHz

Scheme 1

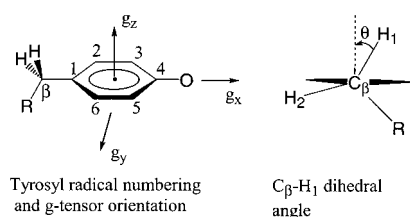


Table 1: Parameters Used for the Simulations of the Spectra

	wide doublet	130 GHz pulsed EPR spectrum	wide singlet	inhibited narrow singlet
$g_x (\sigma_x)^a$	2.0068 (0.0007)	2.0070 (0.0007)	2.0078 (0.0009)	2.0078 (0.0005)
$g_y (\sigma_y)$	2.0040 (0.0003)	2.0041 (0.0004)	2.0043 (0.0003)	2.0043 (0.0001)
$g_z$	2.0020	2.0021	2.0021	2.0021
$H_{3,5} A_x^b$	26	26	26	26
$H_{3,5} A_y$	7	7	7	7
$H_{3,5} A_z$	19	19	19	19
$H_\beta A_x$	51	51	45	27
$H_\beta A_y$	51	51	45	27
$H_\beta A_z$	52	52	50	33

<sup>a</sup>  $\sigma_i$  is the half-width at half-maximum of the Gaussian distribution about  $g_i$ . <sup>b</sup> Absolute values for hyperfine coupling constants are given in megahertz.

spectrum was clearly broader than the 285 GHz spectra, indicating that the line width at this principal  $g$ -value was predominated by hyperfine interaction. By comparison, the line width of the  $g_x$ -edge was approximately frequency independent, indicating the dominance of the Zeeman interaction. The large central  $g_y$ -features exhibited an intermediate behavior. To quantify further these effects, simulations were carried out.

In the simulations, the hyperfine coupling parameters in the fitting procedure were fixed. The values for the ring protons (see Scheme 1 for numbering), which are approximately the same for all tyrosyl radicals (28), were taken from the literature (19). In the case of the WD spectra, the values for the  $\beta$  protons, which are known to be largely isotropic (29), were then adjusted and fixed to account for the line width of the  $g_z$ -edge. The values obtained for the strongly coupled  $\beta$  proton were significantly smaller than those measured by ENDOR at 9 GHz (19) (see below). However, the parameters from the HFEPR spectra gave a satisfactory simulation of the 9 GHz spectrum (see Figure 1 insert). By contrast, the HFEPR line widths of the WS and NS spectra were completely consistent with the hyperfine values obtained from 9 GHz simulations (19), and those values were used for the HFEPR data simulations. As discussed above, the large width of the  $g_x$ - and  $g_y$ -features could not be accounted for solely by hyperfine interactions, and distributions in the  $g_x$ - and  $g_y$ -values were necessary to simulate the experimental data. The variable parameters in the fitting procedure were the three  $g$ -values and the three widths of the Gaussian distribution about these values. The 190 and 285 GHz spectra were fitted simultaneously. The  $g$ -values and distributions obtained from the best fits of the experimental data are listed in Table 1. The calculated HFEPR spectra are plotted in Figure 1 along with the experimental data.

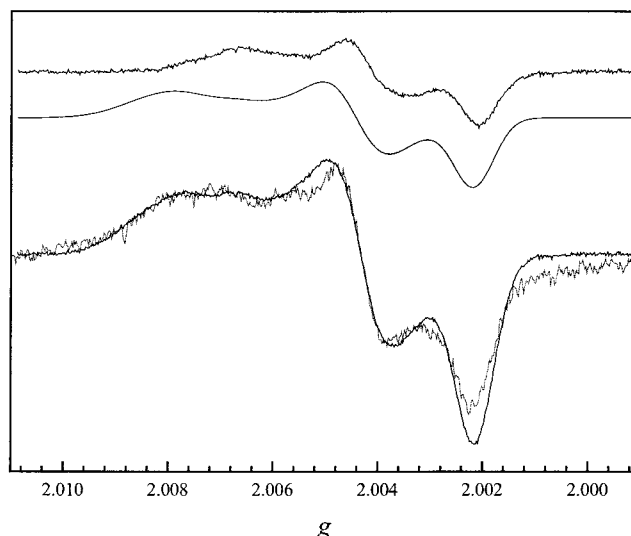


FIGURE 4: Decomposition of the WS 285 GHz HFEPR spectrum into the WD and NS spectra. From top to bottom: WD spectrum, simulated NS powder spectrum {parameters:  $g = [2.0080 (0.0007), 2.0040 (0.0004), 2.0021]$ ,  $A_{3,5} = (26, 7, 20)$  MHz,  $A_\beta = (34, 34, 36)$  MHz}, sum (black) of WD and simulated NS spectra superimposed on the WS spectrum (gray). The parameters used for the NS simulation are different from those obtained from the indomethacin-inhibited NS spectra (see Figure 3, Table 1, and text for details).

The line width of the HFEPR features in the indomethacin-inhibited NS spectrum is narrower compared to the WD species, and a smaller distribution was required in order to fit the spectra. The  $g_x$ -value for the inhibited NS sample was noticeably higher at 2.0078 than the WD species  $g_x$ -value of 2.0068. The WS sample presented an intermediate case with respect to the  $g$ -values and the distribution in  $g_x$ - and  $g_y$ -values. An alternate approach to simulating the high-field WS spectra was an extension of the original proposal by DeGray and co-workers (12) for simulating the 9 GHz WS spectrum: a weighted sum of the spectra corresponding to the WD species and the self-inactivated NS species. This approach considers the WS spectrum to arise from a mixture of the WD and the self-inactivated NS species rather than corresponding to a distinct tyrosyl radical. The ENDOR study of Shi and co-workers (19) has provided evidence supporting this view. It is clear from the HFEPR data that the WS cannot be a mixture of WD and indomethacin-inhibited NS. The range of the WS  $g_x$ -values not only covers the entire range of both the WD and indomethacin-inhibited NS values but also significantly extends to higher  $g$ -values. Therefore, if the WS is indeed the sum of the WD and self-inactivated NS spectra, then the  $g_x$ -values for the two types of NS must be different. Minimally, the extent of the  $g_x$ -edge of the self-inactivated tyrosyl radical must be higher than that of the indomethacin-inhibited NS. The loss of the tyrosyl radical signal amplitude upon further incubation of the sample on ice did not allow us to record the HFEPR spectra on the self-inactivated NS radical. However, it was possible to simulate the WS HFEPR spectra by combining the WD signal with a second spectrum which had a different set of  $g$ -values from that of the indomethacin-inhibited NS spectrum (see Figure 4). The differences in NS  $g$ -values suggest either that the two radicals are on different sites, supporting the conclusion of the earlier ENDOR study (19), or that the



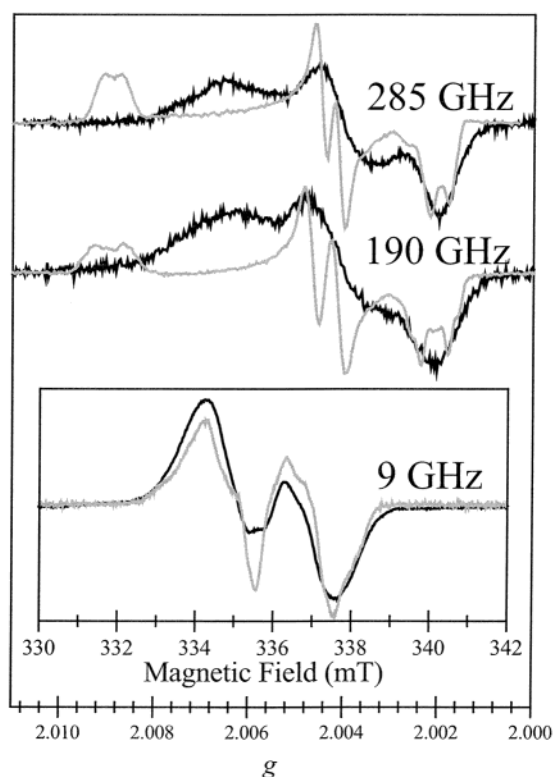


FIGURE 5: EPR spectra of the WD tyrosyl radical in oPGHS-1 (black line) and of the tyrosyl radical in RNR (gray line). Spectra of the WD are as in Figure 1. The resolution of the WD spectra was unaffected by the use of a low modulation amplitude. In each case, all spectra have been recorded on the same sample.

radical site is the same but that the binding of indomethacin greatly affects the electrostatic environment of the residue (20, 21).

The evolution from the WD to the self-inactivated NS-type spectra observed at 9 GHz clearly involves changes in hyperfine couplings. However, the changes in the  $g_x$ -region of the HFEPR spectra cannot be explained only by changes in hyperfine interactions. Hence, the underlying molecular mechanism for the spectral evolution manifests itself differently in conventional and high-field EPR spectra: at 9 GHz, changes in hyperfine couplings are the dominant features whereas changes in the  $g$ -values dominate in the HFEPR data.

The WD hyperfine values obtained for the strongly coupled  $\beta$ -methylene proton measured by ENDOR are similar to those of the RNR tyrosyl radical. Consequently, the 9 GHz spectra of both radicals are similar (see Figure 5). However, in the HFEPR spectra, the resolved features at the  $g_z$ -edge observed in the RNR spectra due to this hyperfine interaction are absent in the WD spectra. The 190 and 285 GHz data clearly show that the apparently lower resolution of the WD spectrum is due to field-independent interactions and not to distributions in  $g$ -values (see Figure 1). A likely explanation is that the dominant  $\beta$ -coupling hyperfine interaction is itself distributed. This would explain why the 9 GHz WD spectrum appears slightly less resolved than the RNR spectrum, yet having the same apparent couplings, and why hyperfine values obtained from HFEPR simulations were smaller than those measured by ENDOR.

To study a possible interaction between the tyrosyl radical and the oxoferryl species and determine if it could influence

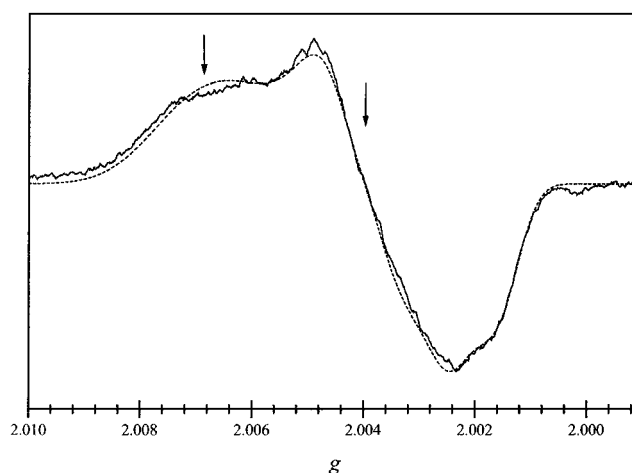


FIGURE 6: 130 GHz Hahn echo-detected EPR spectrum of a 6 s quench oPGHS-1 sample reacted with EtOOH. The numerical derivative of the acquired echo-detected EPR spectrum is presented. The arrows indicate positions at which the pulsed saturation–recovery curves presented in Figure 7 were recorded. Data acquisition parameters were as follows: temperature, 6.0 K; pulse 1 width, 30 ns; pulse 2 width, 60 ns; time between pulses, 150 ns.

the spectral positions and shapes in the EPR spectra, we measured pulsed HF (130 GHz) EPR saturation–recovery curves under conditions which could be compared with well-characterized tyrosyl radical species in ribonucleotide reductase (RNR) systems (20, 30–33). Figure 6 shows the echo-detected field sweep EPR signal obtained at 130 GHz on a 6 s quench sample of oPGHS-1 reacted with EtOOH. The simulation of the spectrum is shown along with experimental data. Simulation parameters are reported in Table 1. Figure 7 shows the 130 GHz pulsed saturation–recovery curves measured at 5.8 K and at field positions corresponding to  $g_x$  and  $g_y$ , respectively. Monoexponential and biexponential fits of the experimental curves are also shown in the figures.

## DISCUSSION

In a series of studies, it has been demonstrated that the  $g$ -values of tyrosyl radicals are sensitive to the local electrostatic environment (20–22). Crystallographic (7) and mutagenesis (14) data show that the likely site of the WD tyrosyl radical, Tyr385, is hydrogen-bonded (see below). The range of  $g_x$ -values found for the PGHS radical(s) is consistent with an electropositive environment due to one or more hydrogen bonds. Furthermore, our HFEPR results indicate that the progression from the WD to the self-inactivated NS-type radical, as observed by conventional 9 GHz EPR spectroscopy, is paralleled by a change from a strongly to moderately hydrogen-bonded tyrosyl radical. HFEPR spectroscopy cannot unambiguously distinguish whether this evolution occurs on a single tyrosyl radical or through a migration of the unpaired spin to one or a series of tyrosyl residues. Because all three types of HFEPR spectra exhibit a  $g_x$ -edge that is continuously rather than discretely distributed and because of the contiguous change of the  $g_x$ -edge during incubation of a single sample, we favor the single site model for the radical. Indeed, the explanation of these two observations in the context of a migration mechanism would require sequential tyrosine sites with progressively weaker distributed hydrogen bonds, which seems unlikely.

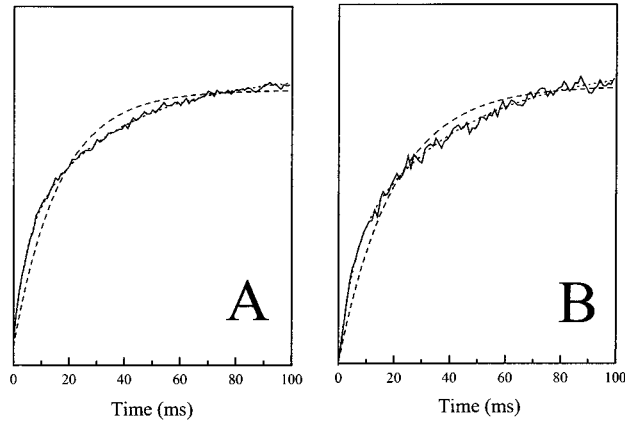


FIGURE 7: 130 GHz pulsed saturation–recovery curves of a 6 s quench oPGHS-1 sample reacted with EtOOH. Panel A: The experimental curve (solid line) was obtained at a field position corresponding to approximately  $g_x$  (4.6295 T). The dotted curve is the best biexponential fit with  $1/T_a = 211 \text{ s}^{-1}$  and  $1/T_b = 25 \text{ s}^{-1}$ . The dashed curve is the best monoexponential fit with  $1/T_1 = 51 \text{ s}^{-1}$ . Panel B: The experimental curve (solid line) was obtained at a field position corresponding to approximately  $g_y$  (4.6558 T). The dotted curve is the best biexponential fit with  $1/T_a = 219 \text{ s}^{-1}$  and  $1/T_b = 29 \text{ s}^{-1}$ . The dashed curve is the best monoexponential fit with  $1/T_1 = 62 \text{ s}^{-1}$ . Data acquisition parameters for both curves were as follows: temperature, 5.8 K; saturating pulse, 60 ms; Hahn echo detection, pulse 1 = 30 ns, pulse 2 = 60 ns, and  $\tau = 150 \text{ ns}$ ; repetition rate, 5 Hz; 300 averages per point.

By contrast, an evolution in hydrogen bonding for a single site is consistent with the phenyl ring rotational model that has been developed to rationalize the evolution of the 9 GHz EPR spectra. The strength of a hydrogen bond critically depends on both the distance and angular orientation between the donor and acceptor. Hence a rotation of the tyrosyl radical acceptor relative to the donor will modulate the strength of the hydrogen bond (34). A potential driving force for such a rotation is the energy difference between hydrogen bonding in the reduced and oxidized species. The hydrogen-bonding energy and geometry of the two redox states are unlikely to be the same. Hence, upon oxidation, rearrangement of the hydrogen-bonding geometry is expected.

A refined 2.7 Å resolution structure of the PGHS synthase has been published recently (7). It shows that Tyr385, the proposed site of the radical, is in very close proximity to another tyrosine residue (Tyr348) with a phenolic oxygen–oxygen distance of 2.78 Å, as well as to a water molecule with an oxygen–oxygen distance of 2.77 Å (see Figure 8), indicating the presence of two relatively strong hydrogen bonds to the radical site. Yet, in their ENDOR study, Shi and co-workers did not detect any exchangeable proton that could be associated with a hydrogen bond in the WD sample, and it was therefore concluded that the tyrosyl radical responsible for the WD signal was not hydrogen-bonded. An argument invoked to support this result was the  $g_x$ -value obtained from simulations of the 9 GHz data which yielded a value of 2.0089. Now that this value has been measured with HFEP, this argument no longer holds and actually points toward the opposite result. Given the large distribution of the  $g_x$ -value required to properly fit the HFEP data, it is likely that any proton ENDOR resonance associated with hydrogen bonds to the phenolic oxygen of Tyr385 would be obscured in the ENDOR spectrum. Such a situation has been previously encountered. In contrast to the tyrosyl D

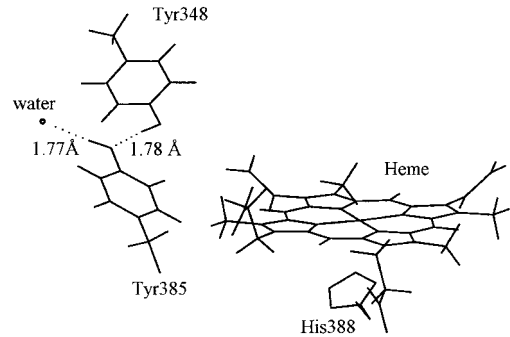


FIGURE 8: Structure of the peroxidase active site of o-PGHS-1 based on the 2.70 Å resolution crystallographic structure of the enzyme complexed with flurbiprofen. To emphasize possible hydrogen bonds involving the tyrosine 385 residue, standard hydrogen atoms were added to the PDB file by using the program Reduce (46). Distances given are oxygen–hydrogen distances. The figure was generated by using the programs Prekin and Mage (47).

Table 2: Parameters Used for the Simulation of the 285 GHz WD Spectrum with the  $S = 1$ ,  $S = 1/2$  Model

	$x$	$y$	$z$
tyrosine $g$ -values	2.0075	2.0043	2.0021
Fe species $g$ -values	2.0012	2.0012	2.0012
interaction tensor (GHz) <sup>a</sup>	0.140 (0.150)	0.015 (0.060)	
zero-field splitting parameters (GHz)	$D = 660$	$E = 0$	

<sup>a</sup> See ref 38 for details on the model. The value in parentheses represents the half-width at half-maximum of a Gaussian distribution.

radical in photosystem II, ENDOR measurements of the tyrosyl Z radical provided no evidence of a hydrogen bond (no  $^2\text{H}_2\text{O}$  exchangeable features could be detected by CW-ENDOR) (35), yet the  $g$ -values of both photosystem II radicals measured by HFEP were nearly identical (34). The key difference between the radicals was a distribution in the  $g_x$ -value of the tyrosyl Z radical. The  $^2\text{H}$  pulsed ENDOR study also indicated the presence of a hydrogen bond which was distributed (36). In the presence of a distributed hydrogen bond, what is observed in the ENDOR experiment could be complicated: some resonances may be broadened beyond detection, and the apparent position of the turning points may be distorted due to the distribution in the position of the radical. In addition, the pocket which constitutes the cyclooxygenase active site in oPGHS-1 is hydrophobic. The crystal structure reveals fewer water molecules in this area, implying a slow solvent exchange rate and thus prohibiting significant changes in proton ENDOR experiments.

Apart from hydrogen bonding, another cause for the low  $g_x$ -value of the WD could be a magnetic interaction with the  $S = 1$  heme iron species. It has been shown in the case of CcP Compound ES (37, 38) that an interaction between the  $S = 1$  oxoferryl moiety and a  $S = 1/2$  radical results in a line shape that is powder pattern-like with effective  $g$ -values that depend on the  $g$ -values for the uncoupled radical corrected by a term proportional to the ratio of the coupling parameter by the zero-field splitting parameter of the iron species. Therefore, a weakly hydrogen-bonded tyrosyl radical coupled to the oxoferryl species could have  $g$ -values such as those measured for the WD species in this study (see Figure 1 and Table 2; it must be noted that no hyperfine interaction is implemented in this specific simulation program; therefore, the broadening of the spectra was accounted

for by a distribution of the coupling parameters). In the case of CcP Compound ES, the tryptophanyl radical is coupled to the oxoferryl iron moiety with a distance between the radical indole nitrogen and the iron ion of 7.1 Å as measured from the crystallographic structure. In the case of PGHS, the distance between the Tyr385 phenolic oxygen and the iron ion is 12.5 Å. Since the dipolar and exchange couplings decrease with increasing distance between the interacting species (39, 40), the interaction is expected to be much weaker for PGHS compared to CcP. At a distance of 12.5 Å, the corresponding dipolar coupling, using a point-dipole model, is  $-27$  MHz ( $\delta = -\mu^0 g^2 \beta^2 / 4\pi r^3$ ). Simulations of the 285 GHz WD spectrum with the  $S = 1$ ,  $S = 1/2$  interaction model, with an intrinsic  $g_x$ -value of 2.0075 for the radical, led to isotropic and dipolar spin-coupling parameters that were below 100 MHz. Therefore, a very weak spin-coupling effect is consistent with the observed broadening. A rotation of the side chain of the tyrosine would modify orbital overlaps, and hence exchange interactions, leading to further weakening of the coupling and increase of the  $g_x$ -value.

Further information on a possible weak coupling between the oxoferryl center and the tyrosyl radical was obtained from high-frequency pulsed saturation-recovery experiments. Previous CW X-band power saturation studies on the PGHS doublet and singlet species produced evidence for an interaction with the oxoferryl center (11, 41). RNR systems provide meaningful comparisons with the PGHS case because the effects of the diferric metal center which produces the relaxation enhancement of the tyrosyl radical can be controlled by temperature: at low temperatures, the paramagnetic  $S = 1$  state of the antiferromagnetically coupled diiron center is significantly depopulated and the tyrosyl radical relaxes near its "intrinsic" (noninteracting) rate; at higher temperatures, the  $S = 1$  state of the metal center becomes populated and increases the relaxation rate of the nearby tyrosyl radical through exchange and dipolar interactions.

The pulsed saturation-recovery curves were measured at 5.8 K and 130 GHz. At this frequency and temperature, the data can be compared to a recent pulsed HFEPR study of *Escherichia coli* and yeast RNR tyrosyl radicals (33). This study found that, below 10 K, the RNR tyrosyl radical saturation-recovery curves exhibited multiexponential behavior which, if best-fit with a single exponential function to give a  $1/T_1$  estimate, exhibited approximately 25% anisotropy in rates across the EPR spectrum. As is clear from the fits presented in Figure 7, both curves obtained from PHGS are best described as at least biexponential, with an anisotropy in the best-fit monoexponential  $1/T_1$  values of 20% between  $g_x$  and  $g_y$  excitation positions. In addition, the best-fit monoexponential  $1/T_1$  values measured for PGHS (62 and 51 s<sup>-1</sup> at 6 K) are in the range of those reported for RNR systems at approximately the same temperature (30–70 s<sup>-1</sup> at 8 K). Because the RNR tyrosyl radical experiences a reduced influence on its relaxation behavior from the diferric iron center at these temperatures (30–32), the similarity of the PGHS tyrosyl radical relaxation behavior to that in the RNR systems suggests that the coupling of the PGHS tyrosyl radical to the oxoferryl center is correspondingly small.

It must be noted that comparisons of the CW saturation behavior of the *E. coli* RNR tyrosyl radical with PSII Y<sub>D</sub> at 245 GHz indicate that the relaxation behavior of the RNR

tyrosyl radical at low and high EPR frequency/field may differ (20). At 4.5 K, the high-frequency RNR tyrosyl spectrum required higher microwave powers for saturation than Y<sub>D</sub> with PSII in the diamagnetic  $S_1$  state, suggesting that either the intrinsic relaxation properties of the radicals differ at high field or the RNR tyrosyl radical experiences an interaction with the diferric center which can be more readily detected at high field. However, at this temperature, the peak positions and line widths of RNR tyrosyl radical EPR spectra acquired at 9 GHz (30), 140 GHz (42), and 245 GHz (20) are not affected by the interaction with the diferric iron center: the spectra can be well simulated as isolated tyrosyl radicals without using electron-electron interactions. Because the small metal-radical interaction present in RNR at these temperatures does not perturb the EPR spectra to any observable extent, and because the relaxation properties of the PGHS radical have been shown to be similar to those of RNR, it is reasonable to conclude that the PGHS spectra are not significantly influenced by coupling to the oxoferryl center. These relaxation results indicate that the  $g_x$ -value and broadening of the WD species are dominated by hydrogen bonding rather than spin-spin interaction with the oxyferryl state.

The oxoferryl species is also an  $S = 1$  species with an  $S = 0$  ground state. However, the zero-field splitting of this species is smaller than that for the diferric center in RNR, and the  $S = 1$  state is significantly populated even at temperatures below 4.2 K. For example, in CcP Compound ES at 4.2 K, the relaxation rates of the coupled tryptophan radical are increased by 2–3 orders of magnitude over those expected for an isolated organic radical (37). As discussed previously, the EPR spectrum of this tryptophan radical is strongly perturbed by the coupling to the iron center. However, the relaxation rates measured for the PGHS radical indicate a much smaller interaction (and thus an Fe-tyrosyl distance significantly greater than the Fe-tryptophan distance of CcP Compound ES) which has a negligible influence on the EPR spectrum.

In summary, the HFEPR data indicate that the WD tyrosyl radical is hydrogen-bonded. However, the hydrogen bonding is distributed, and the electrostatic effect of the hydrogen bond appears to change over time, suggesting that the radical is initially in a strained environment. This change in hydrogen bonding is consistent with the rotation of the phenyl ring with respect to the protein backbone, which would necessarily change the relative orientation of the hydrogen bond donor and, therefore, the hydrogen-bonding energy. It is known from studies of tyrosyl radicals in proteins and model systems that local electrostatic effects, such as hydrogen bonds, can strongly modify the stability and redox properties of the tyrosyl radical (43–45). In the case of PGHS, mutagenesis experiments indicate that Tyr348, one of the likely hydrogen bond donors to the tyrosyl radical, is not essential for cyclooxygenase activity. However, it has been argued that Tyr348 may play a structural role in positioning the substrate relative to Tyr385 (6). Consistent with both the mutagenesis and HFEPR studies is the possibility that the Tyr348 through the hydrogen-bonding interaction induces a reorientation of the radical to promote the hydrogen abstraction from the substrate. Clearly, further HFEPR studies on mutants are required to test this hypothesis.



## ACKNOWLEDGMENT

This work was initiated and done in collaboration with Prof. Jerry Babcock and is dedicated to his memory. We thank Dr. Richard J. Kulmacz and Graham Palmer for help in earlier preliminary results. P.D. and S.U. thank Bill Rutherford and Anabella Ivancich for encouragement and discussions and Guillaume Voyard for technical assistance. We also thank Rajendra Bose Muthukumaran for preliminary checking with 9 GHz EPR the samples used for CW EPR measurements. G.J.G. thanks Vladimir Krymov for technical assistance in the acquisition of the 130 GHz data.

## REFERENCES

- Smith, W. L., Garavito, R. M., and DeWitt, D. L. (2000) *Annu. Rev. Biochem.* 69, 145–182.
- Marshall, P. J., and Kulmacz, R. J. (1988) *Arch. Biochem. Biophys.* 266, 162–170.
- Picot, D., Loll, P. J., and Garavito, R. M. (1994) *Nature* 367, 243–249.
- Kurumbail, R. G., Stevens, A. M., Gierse, J. K., McDonald, J. J., Stegeman, R. A., Pak, J. Y., Gildehaus, D., Miyashiro, J. M., Penning, T. D., Seibert, K., Isakson, P. C., and Stallings, W. C. (1996) *Nature* 384, 644–648.
- Luong, C., Miller, A., Barnett, J., Chow, J., Ramesha, C., and Browner, M. F. (1996) *Nat. Struct. Biol.* 3, 927–933.
- Malkowski, M. G., Ginell, S. L., Smith, W. L., and Garavito, R. M. (2000) *Science* 289, 1933–1937.
- Selinsky, B. S., Gupta, K., Sharkey, C. T., and Loll, P. J. (2001) *Biochemistry* 40, 5172–5180.
- Loll, P. J., Picot, D., Ekabo, O., and Garavito, R. M. (1996) *Biochemistry* 35, 7330–7340.
- Loll, P. J., Picot, D., and Garavito, R. M. (1995) *Nat. Struct. Biol.* 2, 637–643.
- Kulmacz, R. J., Tsai, A.-L., and Palmer, G. (1987) *J. Biol. Chem.* 262, 10524–10531.
- Karthein, R., Dietz, R., Nastainczyk, W., and Ruf, H. H. (1988) *Eur. J. Biochem.* 171, 313–320.
- DeGray, J. A., Lassmann, G., Curtis, J. F., Kennedy, T. A., Marnett, L. J., Eling, T. E., and Mason, R. P. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 23583–23588.
- Kulmacz, R. J., Ren, Y., Tsai, A.-L., and Palmer, G. (1990) *Biochemistry* 29, 8760–8771.
- Tsai, A.-L., Hsi, L. C., Kulmacz, R. J., Palmer, G., and Smith, W. L. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 5085–5091.
- Shimokawa, T., Kulmacz, R. J., DeWitt, D. L., and Smith, W. L. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 20073–20076.
- Smith, W. L., DeWitt, D. L., and Garavito, R. M. (2000) *Annu. Rev. Biochem.* 69, 145–182.
- Tsai, A.-L., Kulmacz, R. J., and Palmer, G. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 10503–10508.
- Tsai, A.-L., and Kulmacz, R. J. (2001) *Prostaglandins Other Lipid Mediators* 62, 231–254.
- Shi, W., Hoganson, C. W., Espe, M., Bender, C. J., Babcock, G. T., Palmer, G., Kulmacz, R. J., and Tsai, A.-L. (2000) *Biochemistry* 39, 4112–4121.
- Un, S., Atta, M., Fontecave, M., and Rutherford, A. W. (1995) *J. Am. Chem. Soc.* 117, 10713–10719.
- Un, S., Gerez, C., Elleingand, E., and Fontecave, M. (2001) *J. Am. Chem. Soc.* 123, 3048–3054.
- Ivancich, A., Mattioli, T. A., and Un, S. (1999) *J. Am. Chem. Soc.* 121, 5743–5753.
- Seibold, S. A., Cerda, J. F., Mulichak, A. M., Song, I., Garavito, R. M., Arakawa, T., Smith, W. L., and Babcock, G. T. (2000) *Biochemistry* 39, 6616–6624.
- Dorlet, P., Rutherford, A. W., and Un, S. (2000) *Biochemistry* 39, 7826–7834.
- Press, W. H., Flannery, B. P., Teukolsky, S. A., and Vetterling, W. T. (1986) *Numerical Recipes*, Cambridge University Press, New York.
- Tsai, A.-L., Palmer, G., and Kulmacz, R. J. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 17753–17759.
- Angstl, R. (1989) *Chem. Phys.* 132, 435–442.
- Babcock, G. T., Espe, M., Hoganson, C., LydakisSimantiris, N., McCracken, J., Shi, W. J., Styring, S., Tommos, C., and Warncke, K. (1997) *Acta Chem. Scand.* 51, 533–540.
- Hoganson, C. W., and Babcock, G. T. (1992) *Biochemistry* 31, 11874–11880.
- Sahlin, M., Petersson, L., Gräslund, A., Ehrenberg, A., Sjöberg, B.-M., and Thelander, L. (1987) *Biochemistry* 26, 5541–5548.
- Hirsh, D. J., Beck, W. F., Lynch, J. B., Que, L. J., and Brudvig, G. W. (1992) *J. Am. Chem. Soc.* 114, 7475–7481.
- Galli, C., Atta, M., Andersson, K. K., Gräslund, A., and Brudvig, G. W. (1995) *J. Am. Chem. Soc.* 117, 740–746.
- Bar, G., Bennati, M., Nguyen, H.-H. T., Ge, J., Stubbe, J., and Griffin, R. G. (2001) *J. Am. Chem. Soc.* 123, 3569–3576.
- Un, S., Tang, X. S., and Diner, B. A. (1996) *Biochemistry* 35, 679–684.
- Tommos, C., Tang, X. S., Warncke, K., Hoganson, C. W., Styring, S., McCracken, J., Diner, B. A., and Babcock, G. T. (1995) *J. Am. Chem. Soc.* 117, 10325–10335.
- Force, D. A., Randall, D. W., Britt, R. D., Tang, X. S., and Diner, B. A. (1995) *J. Am. Chem. Soc.* 117, 12643–12644.
- Houseman, A. L., Doan, P. E., Goodin, D. B., and Hoffman, B. M. (1993) *Biochemistry* 32, 4430–4443.
- Ivancich, A., Dorlet, P., Goodin, D. B., and Un, S. (2001) *J. Am. Chem. Soc.* 123, 5050–5058.
- Coffman, R. E., and Buettner, G. R. (1979) *J. Phys. Chem.* 83, 2387–2392.
- Abragam, A., and Bleaney, B. (1970) *Electron Paramagnetic Resonance of Transition Ions*, Clarendon, Oxford, U.K.
- Lassmann, G., Odenwaller, R., Curtis, J. F., DeGray, J. A., Mason, R. P., Marnett, L. J., and Eling, T. E. (1991) *J. Biol. Chem.* 266, 20045–20055.
- Gerfen, G. J., Bellew, B. F., Un, S., Bollinger, J. M., Jr., Stubbe, J., Griffin, R. G., and Singel, D. J. (1993) *J. Am. Chem. Soc.* 115, 6420–6421.
- Thuresson, E. D., Lakkides, K. M., Rieke, C. J., Sun, Y., Wingerd, B. A., Micielli, R., Mulichak, A. M., Malkowski, M. G., Garavito, R. M., and Smith, W. L. (2001) *J. Biol. Chem.* 276, 10347–10357.
- Word, J. M., Lovell, S. C., Richardson, J. S., and Richardson, D. C. (1999) *J. Mol. Biol.* 285, 1735–1747.
- Richardson, D. C., and Richardson, J. S. (1994) *Trends Biochem. Sci.* 19, 135–138.

BI015871F



## Résumé

Les observations de radicaux organiques dans les enzymes et de leur implication dans les cycles catalytiques n'ont cessé de croître ces dernières années. La spectroscopie de résonance paramagnétique électronique (RPE) à champ intense est un outil de choix pour l'étude de radicaux organiques car elle permet de résoudre la faible anisotropie du tenseur  $g$  pour ces espèces paramagnétiques et d'obtenir des mesures précises pour les valeurs de  $g$ . Un spectromètre fonctionnant à 285 GHz / 10.5 teslas a été construit dans la Section de Bioénergétique du centre d'études du CEA de Saclay. Le travail présentée dans ce mémoire de thèse a porté sur l'application de la RPE à champ intense à l'étude de radicaux organiques présents dans le photosystème II, qui est l'enzyme de dégagement d'oxygène, ainsi que dans les composés I de deux peroxydases, la cytochrome c peroxydase et la prostaglandine synthase.

Le premier chapitre présente la technique de RPE à champ intense de façon générale et introduit l'instrumentation. Une description du spectromètre utilisé à Saclay est faite et les notions importantes pour la suite de l'exposé sont exposées. Les aspects généraux du photosystème II utiles dans la suite du mémoire sont également présentés.

Le second chapitre montre comment les propriétés anisotropes du tenseur  $g$  ont été utilisées pour obtenir des informations structurales quant à l'orientation de radicaux organiques dans le photosystème II. Des échantillons membranaires de photosystème II orientés dans une direction ont été préparés et l'orientation des radicaux tyrosyles  $Y_D^\bullet$ , semiquinone  $Q_A^\bullet$  et phéophytine par rapport au plan de la membrane a été déterminée.

Les enzymes étudiées dans ce travail de thèse sont des métalloprotéines. Les situations de couplages magnétiques entre les centres métalliques et les radicaux organiques présents sont souvent rencontrées dans ces cas-là. Les chapitres 3 à 5 portent sur l'étude de tels systèmes couplés : deux spins  $1/2$  couplés dans le photosystème II (chapitre 3), un spin  $S=1$  couplé à un spin  $S=1/2$  dans le cas des composés I de la cytochrome c peroxydase (chapitre 4) et de la prostaglandine synthase (chapitre 5). Dans le cas de deux spins  $S=1/2$ , il est montré que les spectres enregistrés à champ intense (10 T) et basses températures (4 K) permettent la détermination directe du signe de l'interaction et, par conséquent, de la nature ferromagnétique ou antiferromagnétique du couplage dans le cas d'une interaction d'échange.

Le dernier chapitre présente des situations pour lesquelles l'étude des valeurs de  $g$  permet d'obtenir des informations sur l'environnement électrostatique du radical étudié. Cette propriété est déjà connue pour les radicaux tyrosyles et semiquinones et deux exemples d'illustrations sont présentés concernant les radicaux  $Y_D^\bullet$ ,  $Y_Z^\bullet$ , d'une part, et  $Q_A^\bullet$ , d'autre part, du photosystème II. L'étude est étendue aux radicaux anions de phéophytine en utilisant des mutants du donneur supposé de liaison hydrogène (acide glutamique 130) à l'oxygène de la fonction carbonyle du cycle V de la molécule de phéophytine.